

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAMILA DO NASCIMENTO CARDOSO

**ISOLAMENTO DE ESTIRPES DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*  
RESISTENTES A INIBIDORES DE LIQUORES DE PRÉ-TRATAMENTO DE  
BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR POR EVOLUÇÃO ADAPTATIVA**

CURITIBA

2018

CAMILA DO NASCIMENTO CARDOSO

**ISOLAMENTO DE ESTIRPES DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*  
RESISTENTES A INIBIDORES DE LIQUORES DE PRÉ-TRATAMENTO DE  
BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR POR EVOLUÇÃO ADAPTATIVA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências - Bioquímica, no Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza.

Co-orientadores: Prof. Dr. Marcelo Müller dos Santos e Dr. Roberto Nobuyuki Maeda.

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas.  
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Cardoso, Camila do Nascimento

Isolamento de estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* resistentes a inibidores de liquores de pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar por evolução adaptativa. / Camila do Nascimento Cardoso. – Curitiba, 2018.  
88 p.: il. ; 30cm.

Orientador: Emanuel Maltempi de Souza

Co-orientador: Marcelo Müller dos Santos

Co-orientador: Roberto Nobuyuki Maeda

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

1. *Saccharomyces cerevisiae*. 2. Furfural. Título. II. Souza, Emanuel Maltempi. III. Santos, Marcelo Müller dos. IV. Maeda, Roberto Nobuyuki. V. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

CDD (20. ed.) 661.8

## TERMO DE APROVAÇÃO

CAMILA DO NASCIMENTO CARDOSO

Isolamento de estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* resistentes a inibidores de  
liquores de pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar por evolução  
adaptativa

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre  
no curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências  
Biológicas, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof. Dr. EMANUEL MALTEMPI DE SOUZA - ORIENTADOR  
UFPR



Prof. Dr. DAVID ALEXANDER MITCHELL  
(UFPR)



Prof. Dr. BORIS JUAN CARLOS UGARTE STAMBUK  
(UFSC)

Curitiba, 19 de março de 2018.

Dedico este trabalho ao meu  
marido Adriano, que sempre acreditou na  
minha capacidade e nunca me deixou  
pensar em desistir.

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar e acima de todos, agradeço a Deus por permitir que este sonho se concretizasse ao longo destes dois anos. A Ele tudo se deve.

Aos professores Emanuel Maltempi de Souza e Marcelo Müller dos Santos, pela orientação valiosa, pelos questionamentos e desafios propostos que contribuíram imensamente para o desenvolvimento deste projeto e para minha formação acadêmica.

Ao Dr. Roberto Maeda, pela co-orientação, pelo direcionamento do trabalho, pela ajuda no desenvolvimento experimental, planejamento e análise estatística e pela amizade.

Ao professor David Alexander Mitchell, pelo cuidado na avaliação do projeto e relatório e por levantar correções e sugestões que colaboraram muito para o desenvolvimento do projeto.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências – Bioquímica da UFPR e a todos os professores com quem tive contato neste período, por me aceitarem como aluna do programa de mestrado em parceria com a Novozymes e por participarem da minha formação acadêmica.

À Novozymes Latin America, por me proporcionar a oportunidade de desenvolver um projeto de mestrado acadêmico que também contribísse para minha formação profissional como pesquisadora do departamento de P&D, e por ceder suas instalações, equipamentos e materiais para que eu pudesse desenvolver o trabalho.

Ao meu marido Adriano Cardoso, por todo o amor, incentivo, compreensão, parceria, confiança e companheirismo.

À Dra. Caroline Damo, por ceder os líquidos que foram estudados neste trabalho.

A todos os colegas e amigos do departamento de Pesquisa e Desenvolvimento da Novozymes, pelo suporte, interesse, sugestões e auxílio na parte experimental que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Com sabedoria se constrói a casa,  
e com discernimento se consolida. Pelo  
conhecimento os seus cômodos se  
enchem do que é precioso e agradável.

(Provérbios 24:3-4)



## RESUMO

A demanda pela produção de energias renováveis é crescente, e a produção do etanol de segunda geração, proveniente de biomassas que até então eram consideradas resíduos agroindustriais, já é uma realidade. Apesar disso, muitos desafios ainda não permitem que todo o potencial desta indústria seja atingido. No Brasil, as matérias-primas mais abundantes para a produção de etanol de segunda geração são o bagaço e a palha da cana-de-açúcar. Para que o processo se viabilize, uma etapa de pré-tratamento desta biomassa é imprescindível e ocorre usualmente pelo processo de explosão a vapor. Porém, esta etapa libera uma grande quantidade de inibidores, entre eles ácido acético, hidroximetil-furfural (HMF) e furfural que atuam como inibidores da fermentação realizada por leveduras. Nesse trabalho foram estudados os efeitos destes três compostos sobre o crescimento das linhagens CAT-1, PE-2 e SA-1 de *Saccharomyces cerevisiae* comumente utilizadas no processo industrial de primeira geração. Um estudo em Desenho Central Composto Rotacional (DCCR), com concentrações máximas de 5,4 g/L de ácido acético, 1,5 g/L de HMF e 5,0 g/L de furfural mostrou que o furfural é o responsável pela inibição do crescimento. Através de trabalhos de engenharia evolutiva e utilizando a estirpe CAT-1 como linhagem parental, foi possível obter a linhagem B-6.5. Esta linhagem se mostrou capaz de crescer até 7,0 g/L de massa de leveduras em base seca, em 72 horas, a partir de um inóculo de 0,5 g/L em meio sintético na presença de 6,5 g/L de furfural, ao passo que sua linhagem parental apresentou completa ausência de crescimento. Esta característica se manteve mesmo após 32 gerações cultivadas na ausência do inibidor, indicando que provavelmente trata-se de uma mutação adquirida pela levedura durante os ciclos de adaptação evolutiva em meios contendo concentrações crescentes de furfural.

**Palavras-chave:** pré-tratamento; inibidores; furfural, *Saccharomyces cerevisiae*; evolução adaptativa.



## ABSTRACT

The demand for renewable energy production is increasing, and the production of second generation ethanol from biomass that was previously considered agro-industrial waste is already a reality. Despite this, many challenges still do not allow the full potential of this industry to be achieved. In Brazil, the most abundant raw materials for the production of second generation ethanol are sugarcane bagasse and straw. In order for the process to be feasible, a pretreatment step of this biomass is essential and usually occurs by the steam explosion process. However, on the other hand, this stage releases a large amount of inhibitors, including acetic acid, hydroxymethyl-furfural (HMF) and furfural, that act as inhibitors of yeast fermentation. In this work the effects of these three compounds on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* strains CAT-1, PE-2 and SA-1, commonly used in the first generation industrial process, were studied. A study in Rotational Compound Central Design, with maximum concentrations of 5.4 g/L of acetic acid, 1.5 g/L of HMF and 5.0 g/L of furfural showed that furfural is responsible for inhibition of growth. Through evolutionary engineering work and using CAT-1 as parental strain, it was possible to obtain strain B-6.5. This strain was able to grow up to 7.0 g/L of yeast on a dry basis in 72 hours from a 0.5 g/L inoculum in synthetic medium in the presence of 6.5 g/L of furfural, while its parental strain showed complete absence of growth. This phenotype was maintained even after 32 generations cultured in the absence of the inhibitor, indicating that it is probably a mutation acquired by the yeast during evolutionary adaptation cycles in media containing increasing concentrations of furfural.

**Key words:** pretreatment; inhibitors; furfural; *Saccharomyces cerevisiae* evolutionary adaptation.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Conversão de biomassa lignocelulósica a etanol. Adaptado de NAIK, 2010. ....	18
<b>Figura 2</b> - Estrutura lignocelulósica da biomassa, com representação da celulose, hemicelulose e lignina. (ALONSO et al, 2012). ....	20
<b>Figura 3</b> - Diagrama de fluxo descrevendo os materiais resultantes de uma explosão a vapor. Adaptado de RAMOS, 2003. ....	22
<b>Figura 4</b> - Esquema indicando as principais rotas de formação de inibidores (JÖNSSON, 2013). ....	23
<b>Figura 5</b> - Rotas de conversão do furfural e do HMF em 2-metanol-furano (FM) e 2,5-di-hidroximetilfurano (FDM) em condições aeróbicas (LIU et al, 2009). ....	25
<b>Figura 6</b> - Esquema de fermentação em batelada alimentada com reciclo celular (Melle-Boinot). Adaptado de BASSO et al, 2011. ....	28
<b>Figura 7</b> – Esquema representando os 5 quadrantes considerados para contagem em câmara de Neubauer (destacados em vermelho) ....	41
<b>Figura 8</b> - Estratégia experimental para avaliação da engenharia evolutiva. YPD-0 refere-se ao meio com ausência de furfural e YPD-6.5 refere-se ao meio contendo 6,5 g/L de furfural. Os números adicionados após estas siglas representam o número da batelada. ....	49
<b>Figura 9</b> - Cinética de crescimento das estirpes industriais de <i>S. cerevisiae</i> nos líquidos e em meio sintético YPD. As abreviações CAT, PE e SA referem-se às estirpes CAT-1, PE-2 e SA-1, respectivamente. As abreviações “YPD”, “auto” e “ácido” referem-se aos meios 1, 2 e 3 descritos na seção 5.4.2, respectivamente ...	53
<b>Figura 10</b> - Perfis de consumo de açúcar, crescimento celular e produção de metabólitos em meio sintético YPD (A) e nos líquidos provenientes do tratamento de auto hidrólise (B) e hidrólise ácida (C) da estirpe CAT-1. ....	54
<b>Figura 11</b> - Perfis cinéticos de consumo de açúcar, crescimento celular e produção de metabólitos em meio sintético YPD (A) e nos líquidos provenientes do tratamento de auto hidrólise (B) e hidrólise ácida (C) da estirpe PE-2. ....	55
<b>Figura 12</b> - Perfis cinéticos de consumo de açúcar, crescimento celular e produção de metabólitos em meio sintético YPD (A) e nos líquidos provenientes do tratamento de auto hidrólise (B) e hidrólise ácida (C) da estirpe SA-1. ....	56

<b>Figura 13</b> - Viabilidade celular das linhagens de <i>S. cerevisiae</i> CAT-1, PE-2 e SA- após 12 horas de cultivo em líquidos de hidrólise de bagaço de cana de açúcar.....	57
<b>Figura 14</b> - Perfis de consumo de furanos nos líquidos pelas linhagens CAT-1, PE-2 e SA-1 de <i>S. cerevisiae</i> .....	60
<b>Figura 15</b> - Efeito do ácido acético, HMF e furfural sobre o crescimento celular das linhagens CAT-1 (A), PE-2 (B) e SA-1 (C). ....	69
<b>Figura 16</b> - Resposta em crescimento celular da levedura CAT-1 frente a diferentes concentrações de furfural em meio sintético. ....	70
<b>Figura 17</b> - Dinâmica de transferência de bateladas da engenharia evolutiva. O eixo vertical representa a concentração de células ao final de cada batelada. No eixo horizontal, estão os números sequenciais de cada batelada, bem como a concentração de furfural correspondente.....	71
<b>Figura 18</b> - Crescimento celular em massa seca em meio YPD contendo 6,5 g/L de furfural das linhagens A-6.5, B-6.5 e da parental CAT-1, após reativação.....	73
<b>Figura 19</b> - Comparação das cinéticas de crescimento em líquidos das estirpes CAT-1 e B-6.5. ....	74
<b>Figura 20</b> - Crescimento em massa seca na presença de furfural da linhagem B-6.5. O número da batelada representa também a quantidade de bateladas que a estirpe foi cultivada na ausência de furfural antes de ser submetida a esta condição. ....	75

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Aplicações recentes de evolução adaptativa em <i>S. cerevisiae</i> para uso da biomassa lignocelulósica.....	32
<b>Tabela 2</b> - Desenho experimental da cinética de crescimento.....	43
<b>Tabela 3</b> - Desenho Central Composto Rotacional (DCCR) para determinação de efeito de inibidores de liquor no cultivo das linhagens de levedura.....	45
<b>Tabela 4</b> - Caracterização química dos licores. ....	51
<b>Tabela 5</b> – Parâmetros calculados para o cultivo de 12 horas das linhagens CAT-1, PE-2 e SA-1 em YPD e liquor auto hidrólise. ....	61
<b>Tabela 6</b> - Análise estatística do crescimento celular resultantes do planejamento experimental DCCR para a estirpe CAT-1, em 12, 24 e 48 horas.....	64
<b>Tabela 7</b> - Análise estatística do crescimento celular resultantes do planejamento experimental DCCR para a estirpe PE-2, em 12, 24 e 48 horas.....	65
<b>Tabela 8</b> - Análise estatística do crescimento celular resultantes do planejamento experimental DCCR para a estirpe SA-1, em 12, 24 e 48 horas.....	66
<b>Tabela 9</b> - Número de bateladas, gerações e tempo de engenharia evolutiva para obtenção das linhagens A-6.5 e B-6.5 .....	72

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>16</b>
2.1	BIOCOMBUSTÍVEIS .....	16
2.2	MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS.....	18
2.3	PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA: EXPLOSÃO A VAPOR .....	20
2.4	INIBIDORES DA FERMENTAÇÃO.....	22
2.4.1	Formação dos compostos inibidores .....	22
2.4.2	Mecanismos de inibição .....	24
2.4.3	Mecanismos naturais de detoxificação em <i>S. cerevisiae</i> .....	25
2.5	LEVEDURAS INDUSTRIAIS.....	26
2.5.1	Processo de fermentação de primeira geração .....	26
2.6	EVOLUÇÃO ADAPTATIVA .....	29
2.6.1	Engenharia metabólica clássica .....	29
2.6.2	Evolução adaptativa .....	30
2.6.3	Estudos de evolução adaptativa com <i>S. cerevisiae</i> .....	30
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>34</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
4.1	OBJETIVO GERAL .....	35
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>36</b>
5.1	LIQUORES .....	36
5.2	CEPAS DE LEVEDURAS .....	36
5.3	MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS .....	37
5.4	MEIOS DE CRESCIMENTO E CULTIVO .....	38
5.4.1	Meio de multiplicação .....	38
5.4.2	Meios de cultivo para cinética de crescimento de <i>S. cerevisiae</i> .....	38
5.4.3	Meios de cultivo para o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) .....	39
5.4.4	Meios de cultivo para evolução adaptativa de <i>S. cerevisiae</i> .....	39
5.5	PREPARO DE INÓCULOS .....	39

5.6	DETERMINAÇÃO DE VIABILIDADE CELULAR.....	40
5.7	CINÉTICA DE CRESCIMENTO DAS ESTIRPES DE <i>S. CEREVISIAE</i> .....	41
5.7.1	Determinação da relação massa seca x densidade óptica.....	41
5.7.2	Cinética de crescimento em líquidos.....	42
5.8	EFEITOS DO ÁCIDO ACÉTICO, HMF E FURFURAL NO CRESCIMENTO CELULAR.....	44
5.9	ADAPTAÇÃO EVOLUTIVA.....	46
5.9.1	Determinação do estresse inicial imposto .....	46
5.9.2	Obtenção de estirpe resistente ao líquido por adaptação evolutiva .....	46
5.9.3	Avaliação das estirpes obtidas .....	47
5.9.4	Número de gerações.....	49
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
6.1	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS LÍQUORES .....	51
6.2	CINÉTICA DE CRESCIMENTO DAS ESTIRPES DE <i>S. CEREVISIAE</i> .....	52
6.3	EFEITOS DO ÁCIDO ACÉTICO, HMF E FURFURAL NO CRESCIMENTO CELULAR.....	63
6.4	ENGENHARIA EVOLUTIVA .....	70
6.4.1	Determinação do estresse inicial imposto .....	70
6.4.2	Evolução adaptativa .....	71
6.4.3	Avaliação das linhagens obtidas .....	72
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>77</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>79</b>
	<b>ANEXO I – RELAÇÃO ENTRE MASSA SECA E DENSIDADE ÓTICA PARA AS LINHAGENS CAT-1, PE-2 E SA-1 .....</b>	<b>85</b>
	<b>ANEXO II – RELAÇÃO ENTRE CONCENTRAÇÃO CELULAR E DENSIDADE ÓTICA.....</b>	<b>87</b>
	<b>ANEXO III – ACOMPANHAMENTO DOS LÍQUORES SEM INÓCULO AO LONGO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO CELULAR.....</b>	<b>88</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Em um mundo em que os conceitos de sustentabilidade se fazem cada vez mais necessários, o uso de energias renováveis é uma alternativa que deve ser considerada e que já vem sendo desenvolvida. Neste sentido, pode-se destacar a produção de etanol de segunda geração, proveniente de biomassas até então consideradas resíduos agroindustriais.

O Brasil, um dos maiores produtores mundiais de etanol de primeira geração, produz uma quantidade significativa de bagaço e de palha de cana-de-açúcar como resíduos do processo. Algumas iniciativas para o reaproveitamento deste resíduo já foram colocadas em prática no país, porém ainda existem muitos desafios a serem superados e desenvolvidos.

O pré-tratamento da biomassa, etapa imprescindível para a liberação de açúcares e posterior fermentação, libera uma grande quantidade de compostos inibidores que prejudicam tanto a etapa de hidrólise enzimática quanto a etapa de fermentação.

Este projeto de mestrado foi desenvolvido em uma parceria entre o Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica da UFPR e a Novozymes Latin America, e cujo objetivo foi estudar os efeitos dos principais inibidores provenientes do pré-tratamento (ácido acético, hidroximetilfurfural ou HMF e furfural) sobre o crescimento de estirpes industriais de *Saccharomyces cerevisiae* comumente utilizadas no processo de produção industrial de etanol de primeira geração (CAT-1, PE-2 e SA-1), além de obter novas estirpes com alta resistência a presença daqueles inibidores.

Para isto, foi desenvolvido um protocolo de engenharia evolutiva para obter uma estirpe com maior resistência a estes inibidores a partir da estirpe industrial CAT-1, de forma que ela combine o fenótipo adquirido com a robustez frente às condições industriais que já lhe são características.

Desta forma, o objetivo é obter uma linhagem com potencial para atender ao desenvolvimento da indústria de etanol de segunda geração voltada para todas as especificidades brasileiras.



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 BIOCOMBUSTÍVEIS

Grande parte da energia consumida no mundo é proveniente de energias fósseis, dentre as quais estão o petróleo e o carvão mineral. Essa situação acarreta em problemas claramente contrários aos princípios da sustentabilidade, a saber: a possibilidade de esgotamento destes recursos, oscilação dos preços nos mercados internacionais, altas emissões de CO<sub>2</sub> que são apontadas como grandes responsáveis pelo aquecimento global, entre outros (NAIK, 2010).

Apesar deste cenário, a matriz energética brasileira já é um exemplo de sustentabilidade, pois utiliza 46,8% de fontes renováveis, enquanto a média mundial encontra-se em torno de 14%. O uso da cana-de-açúcar coloca o Brasil, juntamente com os Estados Unidos, como líder na produção de etanol proveniente de matérias primas de primeira geração, em processos muito bem estabelecidos no que diz respeito a mercados e tecnologias (FERREIRA-LEITÃO et al, 2010).

O etanol de primeira geração apresenta algumas vantagens em relação aos combustíveis fósseis no sentido de que as emissões de CO<sub>2</sub> são reduzidas, aliado ao fato de que a tecnologia brasileira de produção de etanol é muito econômica (BASSO, 2011). Por outro lado, existe uma grande preocupação quanto à destinação dos resíduos gerados, e igualmente um grande interesse pelo potencial aumento de produção que estes resíduos representam. O bagaço e a palha de cana são os resíduos agroindustriais mais gerados por esta indústria, cuja composição química compreende celulose, hemiceluloses e lignina, principalmente (SZCZERBOWSKI et al, 2014).

Estes resíduos são fontes abundantes de energia renovável, uma vez que contém hexoses e pentoses polimerizadas em cadeias de celulose e hemicelulose, respectivamente (PALMQVIST et al, 2000). A celulose e hemicelulose são polissacarídeos que podem ser hidrolisados a açúcares e fermentados a etanol. Já a lignina não pode ser fermentada, mas pode ser recuperada e usada como combustível para gerar calor e eletricidade nas indústrias produtoras de etanol (LARSON, 2008). Os monossacarídeos podem ser liberados através da hidrólise do material e posteriormente convertidos a etanol. As pentoses são naturalmente fermentadas por leveduras dos gêneros *Candida* e *Pichia* ou por *Saccharomyces*

geneticamente modificadas, e as hexoses são fermentadas por leveduras convencionalmente utilizadas, como a *Saccharomyces cerevisiae* (JÖNSSON et al, 2013).

No entanto, a viabilidade econômica do processo de produção do etanol de segunda geração depende do completo fracionamento da biomassa. Existem alguns desafios tecnológicos que dificultam a conversão da biomassa a etanol. Dentre eles, podem-se citar: separação da lignina da celulose e hemicelulose para melhorar a eficiência da hidrólise; otimização da hidrólise da celulose e hemicelulose que ocorre em diferentes taxas e temperaturas; fermentação de um complexo de açúcares contendo pentoses, as quais não são fermentadas por cepas industriais usadas na indústria de etanol; melhoramento de bactérias e leveduras fermentativas em relação a tolerância a concentração de etanol, pH e temperatura e expansão da faixa de substratos (SARITHA et al., 2012).

Cerca de 12% do bagaço e 50% da palha da cana-de-açúcar estão disponíveis para o etanol de segunda geração. Considerando que o teor médio de celulose na biomassa é de 30%, a quantidade de etanol produzido seria bastante significativa. Uma tonelada de cana-de-açúcar contém 340 quilos de palha (10% de umidade) e 300 quilos de bagaço (50% de umidade). Desta forma, considerando os rendimentos teóricos das rotas bioquímicas, seria possível produzir um adicional de 36,5 litros de etanol, além dos 80 litros já produzidos a partir da sacarose extraída da cana (FERREIRA-LEITÃO et al, 2010).

De acordo com o levantamento da Conab (Companhia Nacional de Abastecimento) para a safra de cana-de-açúcar de 2011/2012, 560 milhões de toneladas de cana-de-açúcar foram moídas, sendo que aproximadamente 29% desta cana representa seu resíduo. Isto significa que foram produzidas aproximadamente 163 milhões de toneladas de bagaço de cana. Hoje no Brasil existem 385 usinas sucroalcooleiras em operação autorizadas pela Agência Nacional de Petróleo (ANP), de acordo com dados atualizados em 14 de fevereiro de 2018 pelo Jornal Nova Cana, e o bagaço produzido pode ser considerado um potencial energético adormecido. Apesar disso, já existem iniciativas neste sentido no Brasil. Em novembro de 2014, a empresa Raízen iniciou a operação da primeira planta industrial para fabricação do etanol de segunda geração em escala comercial, e hoje produz 40 milhões de litros de etanol a mais por ano. Também em 2014, a

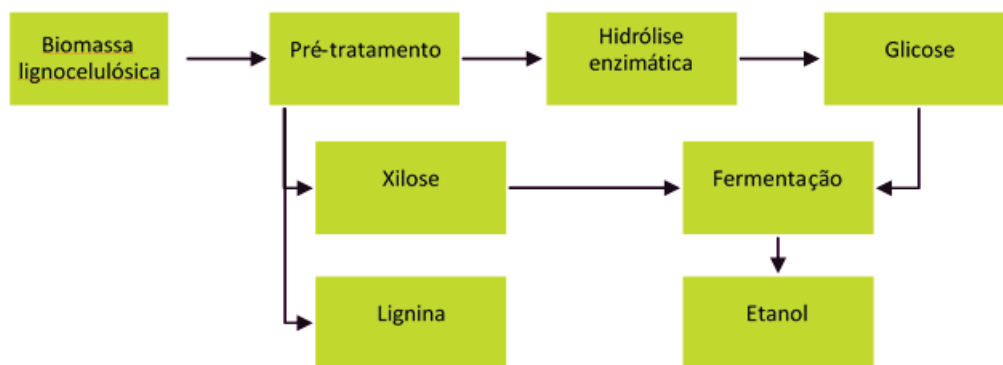
empresa GranBio inaugurou a Bioflex 1, unidade industrial focada em etanol de segunda geração.

## 2.2 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

As tecnologias necessárias para a utilização de materiais lignocelulósicos são complexas e os custos de produção ainda são elevados.

As etapas do processo de produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica são (Figura 1):

1. Pré-tratamento: nesta fase, as pentoses são liberadas da fração hemicelulósica e a celulose torna-se mais disponível para as próximas etapas.
2. Hidrólise ácida ou enzimática: envolve a quebra de polissacarídeos em monossacarídeos.
3. Fermentação dos açúcares: hexoses e pentoses são convertidas a etanol por ação de microrganismos.
4. Separação e concentração do etanol produzido (ALVIRA et al, 2010).



**Figura 1** - Conversão de biomassa lignocelulósica a etanol. Adaptado de NAIK, 2010.

A estrutura rígida e compacta da parede celular da planta confere às biomassas lignocelulósicas uma característica conhecida como recalcitrância, tornando este tipo de material muito pouco acessível a processos biológicos como hidrólise enzimática e fermentação. Esta característica está intimamente relacionada com a estrutura química e física deste tipo de biomassa (ZHAO, 2012).

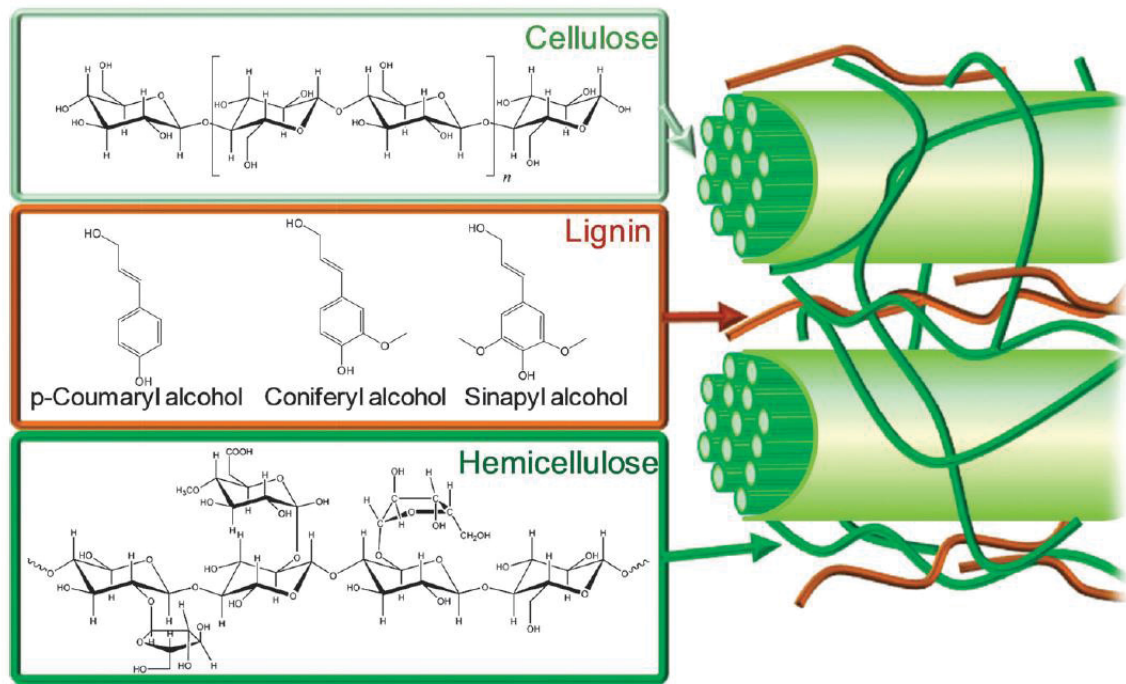
Basicamente, existe uma associação muito forte entre os três principais componentes da parede celular da planta: a celulose, a hemicelulose e a lignina (RAMOS, 2003). A proporção destes componentes é variável dependendo do tipo de biomassa. No caso do bagaço de cana-de-açúcar, sua composição é de 40-45% em celulose, 30-35% em hemicelulose e 20-30% em lignina (PENG et al, 2009).

A celulose é um homopolissacarídeo linear que consiste de unidades de glicose (D-glicopirranose) unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -(1-4). Quanto à sua estrutura, as moléculas são completamente lineares e possuem uma forte tendência em formar ligações de hidrogênio inter e intramoleculares. Feixes de moléculas de celulose se agregam na forma de microfibrilas na qual regiões altamente ordenadas (cristalinas) se alternam com regiões menos ordenadas (amorfas) (McMILLAN, 1994; SUN, 2002).

As hemiceluloses, por sua vez, são cadeias menores e amorfas de polímeros de hexoses, pentoses e ácidos urônicos, e estão ligadas por pontes de hidrogênio à celulose, intercalando-se às suas microfibrilas e conferindo elasticidade. As hemiceluloses podem ser classificadas como hexosanas (heteropolímeros compostos de mananas, galactanas e glicanas) e pentosanas (xilanas e arabinanas). Xilanas e glucomananas são os carboidratos dominantes na composição da hemicelulose (McMILLAN, 1994; SUN, 2002).

A lignina é uma molécula tridimensional amorfa formada pela polimerização dos ácidos cumarílico, coniferílico e sinapílico, cuja variação na proporção resulta em diferentes tipos de lignina. A lignina e a hemicelulose formam uma espécie de revestimento ao redor das fibras de celulose, conferindo rigidez estrutural à parede celular (McMILLAN, 1994; SUN, 2002).

A Figura 2 mostra um esquema da estrutura lignocelulósica, bem como da estrutura química de cada um dos seus principais componentes. No caso da lignina, a figura evidencia apenas as estruturas dos monômeros que a compõe.



**Figura 2** - Estrutura lignocelulósica da biomassa, com representação da celulose, hemicelulose e lignina. (ALONSO et al., 2012).

### 2.3 PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA: EXPLOSÃO A VAPOR

A fim de remover a lignina, solubilizar a hemicelulose e expor a celulose de maneira mais eficiente à hidrólise enzimática, uma etapa de pré-tratamento se faz necessária (ROMANÍ et al, 2015), devido às barreiras físicas e químicas que dificultam a hidrólise destes materiais (RAMOS, 2003). Um pré-tratamento eficiente deve atender aos seguintes requisitos:

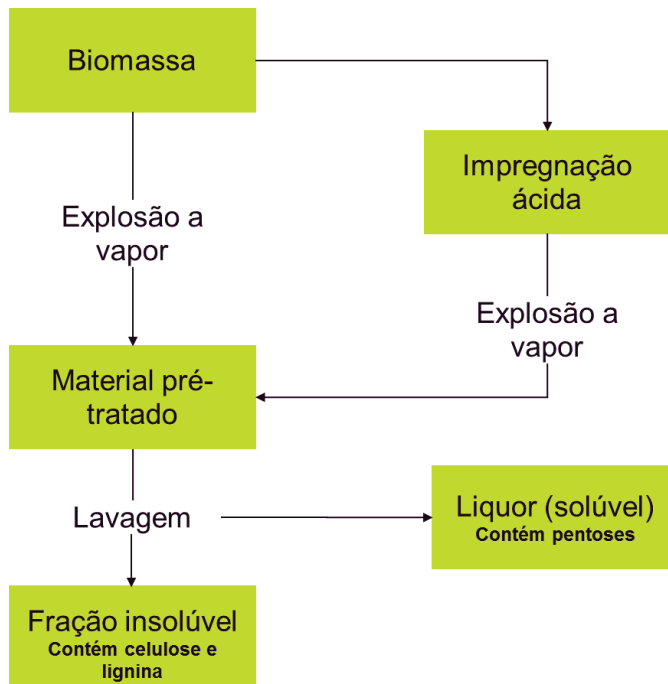
1. Aumentar a formação de açúcares ou a capacidade de formar açúcares subsequentemente por hidrólise enzimática.
2. Evitar a degradação ou perda de carboidratos.
3. Evitar a formação de subprodutos inibidores das etapas subsequentes de hidrólise ou fermentação.
4. Ser economicamente viável (SUN, 2002).

Hidrólises enzimáticas sem prévio tratamento do material, em geral, possuem recuperação de açúcares menor que 20%, ao passo que quando uma etapa de pré-tratamento é empregada, o rendimento pode ultrapassar 90%. Existem

muitos tipos de pré-tratamento que podem ser empregados, podendo ser físicos, químicos, biológicos ou através de fracionamento por solventes (OGEDA et al, 2010).

A explosão a vapor é uma forma de pré-tratamento bastante efetiva na aplicação em bagaço de cana-de-açúcar (KAAR et al, 1998). Comparado às outras tecnologias de pré-tratamento, a explosão a vapor apresenta vantagens de ter um baixo impacto ambiental, baixo investimento de capital, condições e processos químicos menos perigosos, possibilidade de processamento de partículas maiores de biomassa, entre outras (JACQUET et al., 2012). Neste método, o substrato é depositado em um vaso de pressão e aquecido através de injeção de vapor por um tempo (de alguns segundos a vários minutos) e temperatura (160-290°C) definidos, até que a pressão é liberada explosivamente. Esse processo ocorre com ou sem a presença de catalisadores químicos, que podem ser, por exemplo, ácido sulfúrico, dióxido de enxofre ou amônia (OGEDA et al, 2010; RAMOS, 2003).

Neste processo, esquematizado pela Figura 3, o vapor a alta pressão modifica radicalmente a estrutura da parede celular da planta, resultando em um material de coloração marrom-escuro, que contém basicamente uma proporção significativa da fração de hemicelulose que se tornou solúvel, dando origem à fração líquida ou liquor (MORJANOFF e GRAY, 1987). No caso do bagaço de cana, o liquor é constituído principalmente por polímeros de D-xilose, que pode ser facilmente recuperado através de uma lavagem com água. A fração insolúvel é composta por celulose, hemicelulose residual e lignina quimicamente modificada, e segue para a etapa de hidrólise enzimática por meio da ação de celulasas (ROMANÍ et al, 2015; RAMOS, 2003).



**Figura 3** - Diagrama de fluxo descrevendo os materiais resultantes de uma explosão a vapor. Adaptado de RAMOS, 2003.

Em geral, a impregnação prévia com ácido sulfúrico resulta em níveis mais altos de recuperação de xilose (RAMOS, 2003). Por outro lado, esta etapa implica no aumento da severidade do pré-tratamento, significando que uma grande variedade de outros compostos químicos também serão liberados em maiores quantidades, a saber: compostos furanos, compostos fenólicos e ácidos orgânicos, que podem apresentar um efeito inibitório na etapa de hidrólise enzimática e de fermentação, dependendo de sua concentração nos hidrolisados obtidos. A presença e concentração destes compostos estão intimamente relacionadas ao grau de severidade do processo de pré-tratamento aplicado (PALMQVIST et al, 2000; JACQUET et al, 2015).

## 2.4 INIBIDORES DA FERMENTAÇÃO

### 2.4.1 Formação dos compostos inibidores

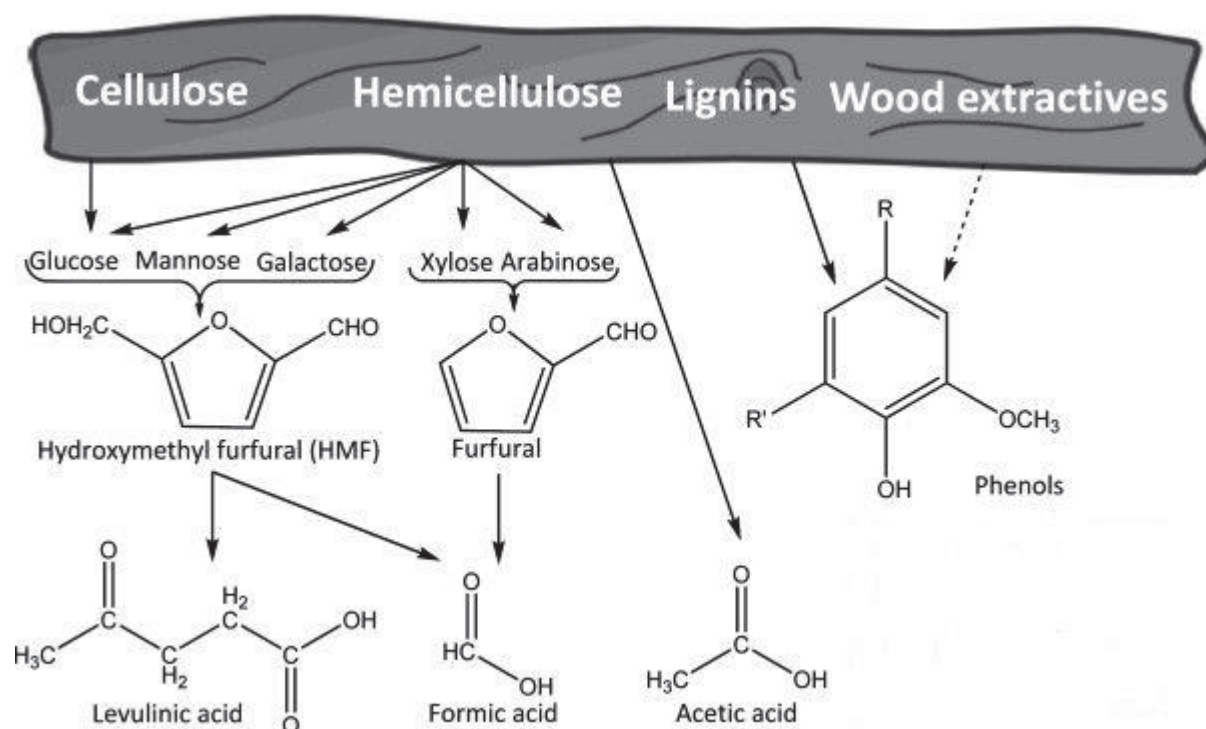
Especificamente em relação à inibição da fermentação alcoólica, a produção de açúcares monossacarídicos através de pré-tratamentos ácidos e termoquímicos implica na liberação de produtos de degradação indesejáveis (Figura 4), como



furanos, compostos fenólicos e ácidos orgânicos fracos, dentre os quais se destacam o ácido acético (PEREIRA et al, 2014). Entre os inibidores produzidos, o furfural, o 5-(hidroximetil)furfural (hidroximetilfurfural ou HMF) e o ácido acético são os compostos inibidores mais importantes derivados do pré-tratamento (NEVES et al, 2016), capazes de provocar efeitos negativos no cultivo de *S. cerevisiae* no que diz respeito ao crescimento celular, metabolismo e rendimento em etanol (VAN MARIS et al, 2006).

O ácido acético é derivado da hidrólise de grupos acetil ligados às cadeias de hemicelulose, que são liberados devido às altas temperaturas impostas pelo pré-tratamento (AMORES et al, 2013).

Quimicamente, o HMF e o furfural compreendem um anel furano heteroaromático e um grupo funcional aldeído (ALMEIDA et al, 2009). O furfural é derivado da desidratação de pentoses (principalmente xilose no bagaço de cana-de-açúcar, que é a pentose predominante), enquanto o 5-hidroximetil-furfural (HMF) é formado a partir da desidratação de hexoses, como a glicose (HANLY et al, 2014).



**Figura 4** - Esquema indicando as principais rotas de formação de inibidores (JÖNSSON, 2013).

As concentrações destes subprodutos aumentam na medida em que aumenta a severidade do pré-tratamento (AMORES et al, 2013), o que pode se dar através de aumento de temperatura, aumento do tempo de tratamento ou através de catálise ácida, por exemplo (RAMOS, 2003). Previamente à explosão a vapor, é comum que o material seja impregnado com ácido sulfúrico, o que pode aumentar significativamente as concentrações de compostos inibidores (PALMQVIST et al, 2000). Um material impregnado com ácido sulfúrico pode apresentar um aumento de três vezes na concentração de furfural e HMF, além de um aumento de duas vezes nas concentrações de ácidos alifáticos, dentre os quais se encontra o ácido acético, quando comparado a um material que não sofreu impregnação ácida antes da explosão a vapor (MARTIN et al, 2002). Por outro lado, a impregnação com ácido aumenta a severidade do pré-tratamento, levando a um aumento na solubilização da hemicelulose e, conseqüentemente, a um aumento da concentração de xilose no liquor (KLING et al, 1987).

#### 2.4.2 Mecanismos de inibição

Os vários inibidores atuam por mecanismos diferentes sobre as células de levedura.

O ácido acético, num meio de fermentação, encontra-se predominantemente na forma não dissociada, em um pH mais baixo que seu pKa (4,76), de forma que permeia a membrana plasmática da levedura através de difusão simples. O pH natural do citosol, que é neutro, por sua vez, permite que estes ácidos se dissociem, levando a uma acidificação da célula e afetando negativamente o crescimento celular, metabolismo e rendimento em etanol (ALMEIDA et al, 2007; BASSO, 2011; SAKIHAMA et al, 2015).

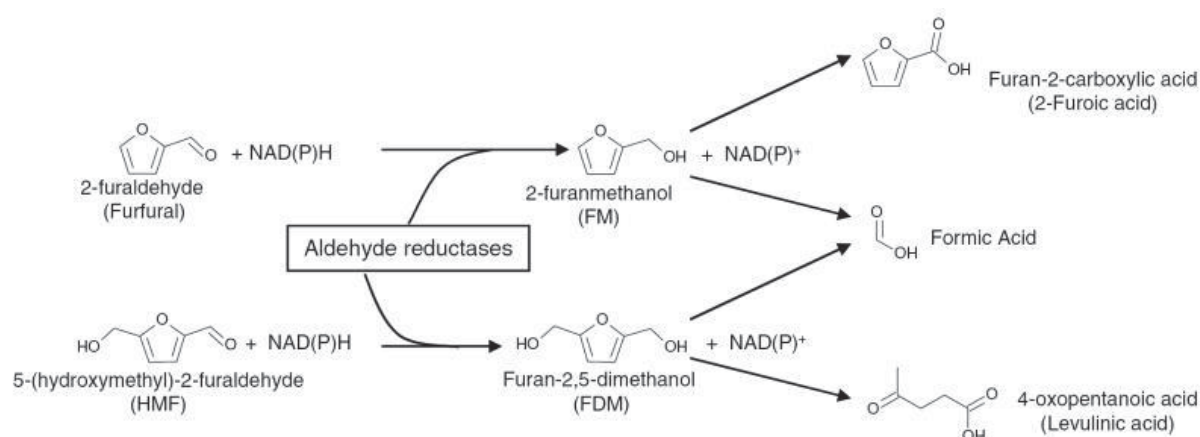
Os efeitos nocivos decorrentes da exposição da levedura ao HMF e furfural, por sua vez, estão relacionados à redução de atividades enzimáticas e biológicas, quebra de DNA e inibição de síntese de RNA e proteínas (LIU et al, 2004), uma vez que os grupos aldeído provocam um aumento nas espécies reativas de oxigênio (PERRONE et al, 2008). Há um decréscimo tanto na velocidade específica de crescimento quanto na velocidade de produção de etanol após a adição de furfural ao meio de cultura, tanto em cultivos aeróbicos quanto anaeróbicos, evidenciando

que a glicólise de *S. cerevisiae* é afetada por este composto furano (TAHERZADEH et al, 1999). Este resultado está de acordo com o relato de que as desidrogenases glicolíticas são as enzimas mais sensíveis à exposição das leveduras ao furfural (BANERJEE et al, 1981).

#### 2.4.3 Mecanismos naturais de detoxificação em *S. cerevisiae*

A fim de minimizar os efeitos dos inibidores, duas estratégias podem ser adotadas: a remoção destes compostos previamente à fermentação ou a utilização de estirpes mais resistentes a eles. Métodos físicos, químicos e biológicos vêm sendo propostos para detoxificação do meio (PALMQVIST et al, 2000). Alternativamente, o uso de leveduras que já possuem a capacidade de metabolizar os compostos inibidores pode evitar a inserção de etapas adicionais no processo, que aumentam os custos e a complexidade operacional, além de gerar resíduos adicionais (LIU et al, 2004).

A bioconversão do furfural e do HMF, em condições aeróbicas se dá pela sua redução a 2-metanol-furano (FM) e 2,5-di-hidroximetilfurano (FDM), respectivamente, através da ação de enzimas aldeído redutases e oxidação das coenzimas NADH ou NADPH (ALMEIDA et al, 2009), como ilustra a Figura 5. Estes compostos podem ainda formar ácidos orgânicos (LIU et al, 2009).



**Figura 5** - Rotas de conversão do furfural e do HMF em 2-metanol-furano (FM) e 2,5-di-hidroximetilfurano (FDM) em condições aeróbicas (LIU et al, 2009).

No caso do furfural, a condição de cultivo determina o produto formado. Em condições aeróbicas, o composto é exclusivamente convertido a ácido furóico. Em condições anaeróbicas, o furfural é convertido a álcool furfurílico, um composto furano substituído por um grupo hidroximetil (HORVÁTH et al, 2003; ALMEIDA et al, 2007).

Os mecanismos para contornar os efeitos tóxicos do ácido acético, por sua vez, envolvem a captura da forma ionizada do acetato, aumento da atividade de H<sup>+</sup>-ATPase na membrana plasmática e efluxo do acetato através de transportadores específicos (MIRA et al, 2010).

A capacidade das leveduras em se adaptar e transformar HMF e furfural oferece um potencial de detoxificação *in situ*, permitindo o desenvolvimento de estirpes tolerantes visando a produção de biocombustíveis (LIU et al, 2004).

## 2.5 LEVEDURAS INDUSTRIAIS

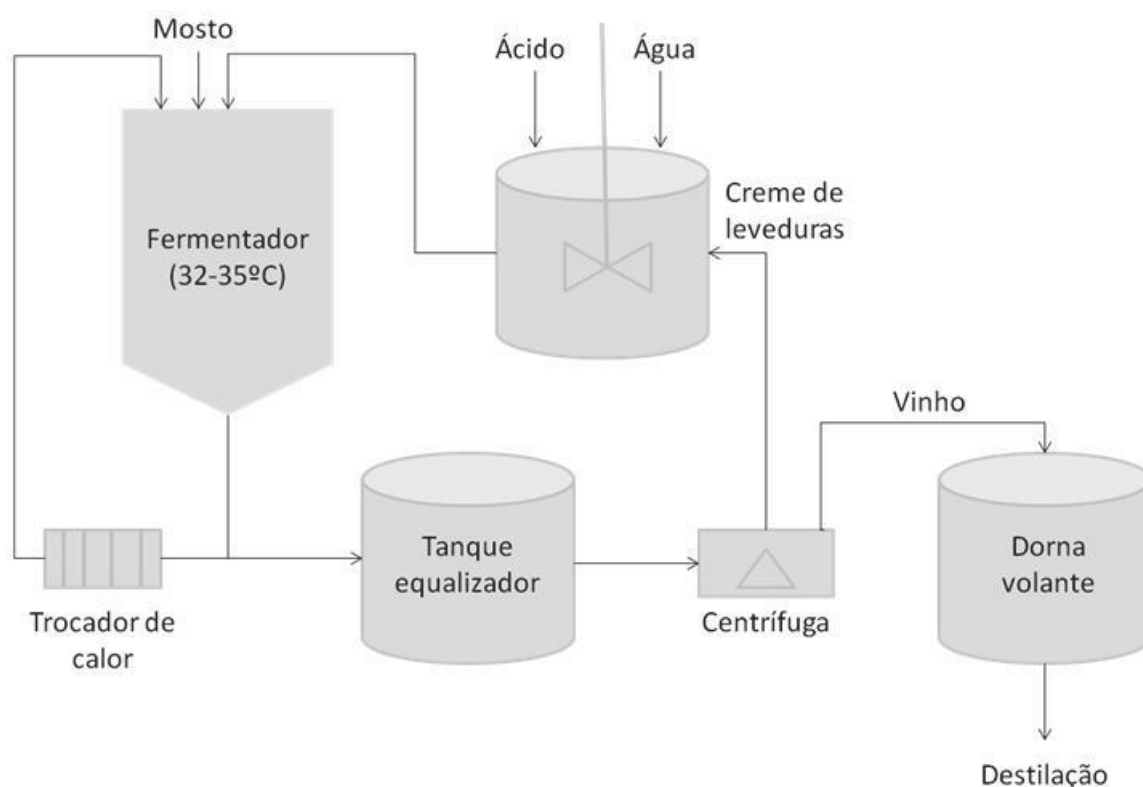
Como mencionado anteriormente, as pentoses podem ser convertidas a etanol por leveduras como *Candida* e *Pichia*. *Saccharomyces cerevisiae*, por sua vez, é uma levedura tradicionalmente utilizada na indústria de etanol de primeira geração, porém bastante suscetível a condições de estresse relacionadas à biomassa lignocelulósica (LIU et al, 2009). Entretanto, a capacidade de superar os efeitos tóxicos dos inibidores provenientes deste processo é apenas uma das características desejáveis para aplicação industrial. Uma levedura utilizada industrialmente deve também apresentar uma série de outras características que viabilizem a condução do processo, as quais serão discutidas a seguir.

### 2.5.1 Processo de fermentação de primeira geração

Neste sentido, torna-se interessante analisar o processo de fermentação típico da indústria sucroalcooleira brasileira, baseado em caldo e melaço de cana-de-açúcar e na levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Em geral, a fermentação é operada em batelada alimentada, inspirado no processo de Melle-Boinot (Figura 6), e começa com a adição de mosto (uma mistura de caldo e melaço, em proporções variáveis de forma que se atinja 180 a 220 g/L de

açúcares redutores totais) a uma suspensão de células de levedura. Esta suspensão possui aproximadamente 30% de células em base seca e representa de 25 a 30% do volume total da fermentação, que pode ocorrer em tanques de 300 a 3000 m<sup>3</sup>. A alimentação leva de 4 a 6 horas, e a fermentação é finalizada entre 6 e 10 horas, resultando em teores finais de etanol que variam de 8 a 12% (v/v). Idealmente, as temperaturas são mantidas entre 32 e 35°C, embora o resfriamento nem sempre seja eficiente na remoção de calor, fazendo com que, durante o verão, as temperaturas atinjam 40°C. Quando o processo de fermentação acaba, as células de levedura são separadas por centrifugação, resultando em uma suspensão concentrada de leveduras, chamada creme, que contém de 60 a 70% de células (m/v, em base seca). O creme é então diluído com água numa proporção de 1:1 e tratado com ácido sulfúrico (pH 1,8 – 2,0) durante 2 horas, a fim de reduzir a contaminação bacteriana, uma vez que o processo não acontece em condições assépticas. Desta forma, após o tratamento ácido, a suspensão de células está pronta para ser reutilizada em um novo ciclo de fermentação. A safra de cana-de-açúcar dura entre 200 e 250 dias, e cada suspensão é reutilizada em média duas vezes por dia. O fermentado que é separado das leveduras na etapa de centrifugação, também chamado de vinho, segue para a recuperação do etanol em etapas de destilação. O resíduo final chama-se vinhaça, que é encaminhado aos campos de irrigação e utilizado como fertilizante por possuir um alto teor de potássio, cálcio, magnésio e outros micronutrientes (BASSO et al, 2011).



**Figura 6** - Esquema de fermentação em batelada alimentada com reciclo celular (Melle-Boinot). Adaptado de BASSO et al, 2011.

Dada a descrição do processo de fermentação a que estas leveduras são submetidas, pode-se afirmar que as leveduras selecionadas de diversas plantas industriais são bastante robustas, uma vez que estão adaptadas às condições extremamente severas impostas pela fermentação industrial, a saber: alto teor alcoólico, altas temperaturas, estresse osmótico devido à presença de açúcares e sais, acidez e contaminação bacteriana, sendo que alguns destes fatores apresentam inclusive ações sinérgicas (BASSO et al, 2008).

Dentre as estirpes selecionadas para este estudo estão CAT-1, PE-2 e SA-1, que têm características desejáveis ao processo, como baixa formação de espuma, ausência de floculação e capacidade de metabolizar todo o açúcar do mosto. Estas três estirpes, juntamente com a BG-1, FT858L e Fermel são amplamente empregadas nas destilarias brasileiras e respondem por 70% do etanol produzido no Brasil, de acordo com a União dos Produtores de Bioenergia (UDOP). Foram avaliadas em cerca de 40% das destilarias onde foram introduzidas e apresentaram uma grande capacidade de permanecer no processo ao longo dos ciclos da safra (MOREIRA et al, 2013). Estas características tornam estas linhagens boas

candidatas a serem trabalhadas para desenvolver maior tolerância aos inibidores provenientes da hidrólise de materiais lignocelulósicos e, desta forma, serem empregadas em um processo industrial da produção de etanol de segunda geração em uma unidade acoplada a uma planta de primeira geração, por exemplo.

## 2.6 EVOLUÇÃO ADAPTATIVA

### 2.6.1 Engenharia metabólica clássica

A engenharia metabólica clássica baseia-se na manipulação genética previamente definida, que irá gerar o benefício esperado através da mudança de uma via bioquímica, o que depende do conhecimento do sistema metabólico de interesse. Entretanto, fazer a engenharia de uma máquina celular complexa acaba se tornando o maior desafio da engenharia metabólica, pois uma grande parte dos estudos resulta em consequências metabólicas diferentes das esperadas pelas mudanças genéticas introduzidas. O problema clássico encontrado no emprego da engenharia metabólica recai na identificação da etapa limitante do fluxo em uma determinada rota (ALKIM et al, 2014; BAILEY et al, 1996, ÇAKAR et al, 2012).

Por este motivo, podem ser citadas as seguintes limitações para esta técnica:

1. Requerimento de uma grande quantidade de informações bioquímicas e genéticas detalhadas sobre o metabolismo ou rota metabólica de interesse, fatores regulatórios, enzimas envolvidas e suas cinéticas, entre outros;
2. Respostas fisiológicas complexas, como a ativação de rotas metabólicas alternativas pela célula em resposta à inibição de uma rota conhecida por engenharia metabólica. Dessa forma, uma grande quantidade de experimentos se fazem necessários para estimar os resultados de uma alteração de forma realista;
3. Questões regulatórias no que diz respeito ao uso de organismos geneticamente modificados na indústria de alimentos e falta de vetores de clonagem e métodos necessários para sua manipulação genética (ALKIM et al, 2014; BAILEY et al, 1996, ÇAKAR et al, 2012).



### 2.6.2 Evolução adaptativa

A evolução adaptativa, ou engenharia evolutiva, é uma estratégia para o melhoramento de microorganismos, baseando-se no princípio da variação e seleção natural. Trata-se de uma estratégia de engenharia metabólica inversa baseada no aumento de diversidade genética e triagem de populações para fenótipos de interesse, e inclui todas as modificações e perturbações genéticas aleatórias, dependendo principalmente de mutagênese aleatória de todo ou parte do genoma, por meio de experimentos de evolução que permitem selecionar linhagens com características diferenciadas (ALKIM et al, 2014).

Esta estratégia é uma alternativa e até mesmo um complemento à engenharia metabólica, na busca de fenótipos desejados através da imposição de pressão seletiva.

Um método clássico para o desenvolvimento de estirpes microbianas é a mutagênese química ou física seguida por uma seleção direta em um meio de cultura que represente uma pressão seletiva para os mutantes melhorados, como, por exemplo, alta concentração de sais ou metais, temperaturas mais altas ou mais baixas do usual para o organismo em questão. O grande inconveniente deste método relativamente simples é que os mutantes podem apresentar uma determinada propriedade altamente melhorada em condições seletivas, mas as taxas de crescimento são menores que da estirpe selvagem em condições normais.

A engenharia evolutiva tem uma abordagem mais simples: cultivos em batelada na presença de um fator que impõe uma pressão seletiva ou, alternativamente, cultivos prolongados em podem ser feitos em condições seletivas. Mutantes espontâneos ou induzidos na população inicial mais adaptados ao fator de pressão presente nos cultivos são selecionados. Estas variantes mais adaptadas possuem a capacidade de sobreviver e crescer melhor que as células originais sob as condições de seleção (ÇAKAR et al, 2012).

### 2.6.3 Estudos de evolução adaptativa com *S. cerevisiae*

O uso da engenharia evolutiva ou evolução adaptativa em *S. cerevisiae* já se mostrou bastante relevante na obtenção de linhagens que possuem fenótipos

industrialmente desejados, como utilização mais eficiente de substratos específicos, maior tolerância a fatores de estresse, dentre outros (WISSELINK et al, 2009).

Na literatura, encontram-se vários exemplos que podem ilustrar a efetividade de aplicação desta metodologia na obtenção de fenótipos desejados. A Tabela 1 reúne alguns exemplos encontrados na literatura sobre estudos de engenharia evolutiva em estirpes de *S. cerevisiae* relacionados às aplicações em biomassa lignocelulósica.

Nenhum destes trabalhos, no entanto, trabalhou com a evolução de uma estirpe industrial brasileira, que apresentam características industrialmente relevantes acumuladas ao longo da exposição às condições severas do processo industrial de produção de etanol de primeira geração.

**Tabela 1** - Aplicações recentes de evolução adaptativa em *S. cerevisiae* para uso da biomassa lignocelulósica

Objetivo	Estratégia	Tempo de evolução	Resultado	Referência
Adaptar uma linhagem recombinante capaz de utilizar pentoses para hidrolisado de bagaço de cana contendo inibidores de fermentação	Cultivo contínuo, cujas alimentações ocorriam em concentrações crescentes de inibidores	353 horas	Em um meio contendo 75% do hidrolisado, houve aumento de 22 para 74% na detoxificação do furfural e de 20 para 40% na detoxificação do HMF. O meio continha 2,3 g/L e 1,0 g/L de furfural e HMF, respectivamente	MARTÍN et al, 2007
Termotolerância e tolerância aos inibidores de pré-tratamento em hidrolisado de coníferas	Transferências sequenciais em hidrolisado, com aumento gradual da temperatura	280 gerações	Aumento de 5 vezes no número de células em 23 horas de crescimento, em hidrolisado contendo aproximadamente 3,0 g/L de HMF e 1,0 g/L de furfural	WALLACE-SALINAS et al, 2013
Tolerância aos inibidores gerados a partir de pré-tratamento por explosão a vapor de eucalipto	Fermentações em batelada com reciclo celular em meio sintético com aumento sequencial da concentração de inibidores	38 bateladas	Aumento de 70% na taxa de crescimento em hidrolisado contendo 2,7 g/L de ácido acético, 0,6 g/L de furfural e 0,12 g/L de HMF	LANDAETA et al, 2013

Adaptação de uma linhagem recombinante capaz de consumir xilose aos inibidores presentes em palha de trigo pré-tratada	Cultivos sequenciais em batelada, com aumento progressivo da proporção de hidrolisado no meio	250 gerações	Aumento de 65% no consumo da xilose em um hidrolisado contendo 0,7 g/L de furfural, 0,15 g/L de HMF e 2,6 g/L de ácido acético	TOMÁS-PEJÓ et al, 2010
Tolerância ao ácido acético de uma linhagem recombinante capaz de consumir xilose	Cultivos sequenciais em batelada com aumento progressivo da concentração de ácido acético, em meio sintético	54 bateladas (400 gerações)	Capacidade de crescimento em pH 4,0 e 5,0 g/L de ácido acético, condição em que não houve crescimento para a estirpe parental. Após estoque e reavaliação da cultura, no entanto, não houve crescimento	WRIGHT et al, 2011

### 3 JUSTIFICATIVA

Dadas as iniciativas das empresas Raízen e Granbio, pode-se dizer que a produção de etanol de segunda geração já começou a dar os primeiros passos.

Sendo a cana-de-açúcar a matéria prima majoritariamente utilizada no Brasil para a produção de etanol, unidades de primeira geração naturalmente devem se equipar para produzir etanol de segunda geração de forma acoplada já que o resíduo gerado na primeira etapa é a matéria prima para o segundo processo. É possível, ainda, idealizar processos de fermentação acoplados com misturas de substratos (melaço, hidrolisado e liquor) em diferentes proporções, dependendo das saídas de cada operação unitária e da época de safra.

O desenvolvimento de uma estirpe de levedura capaz de superar as limitações impostas pelo pré-tratamento de biomassa e que seja também industrialmente robusta é uma demanda da indústria sucro-alcooleira e que ainda está em desenvolvimento.

A proposta deste projeto é estudar a viabilidade e a eficácia do uso da engenharia evolutiva para a obtenção de uma estirpe de *S. cerevisiae* com maior tolerância frente aos principais inibidores provenientes do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar, utilizando como linhagem parental uma cepa industrial de uso consolidado na indústria de primeira geração.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo geral desenvolver uma estirpe de *Saccharomyces cerevisiae* resistente aos principais inibidores identificados provenientes de pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar através de engenharia evolutiva e partindo de uma linhagem industrial utilizada no processo de produção de etanol de primeira geração no Brasil.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste projeto são listados a seguir:

- Determinar o efeito da severidade do pré-tratamento (com e sem impregnação prévia de ácido sulfúrico) sobre as concentrações de ácido acético, HMF, furfural e compostos fenólicos nos líquidos produzidos;
- Caracterizar a cinética de crescimento das estirpes CAT-1, PE-2 e SA-1 em ambos os líquidos;
- Determinar os limites de tolerância das estirpes frente ao ácido acético, furfural e HMF e os efeitos destes compostos isoladamente e em sinergia.
- Obter estirpes com resistência aumentada aos compostos inibidores de líquido de pré-tratamento utilizando evolução adaptativa.
- Determinar o número de gerações que a característica de resistência adquirida se mantém mesmo após sucessivas multiplicações na ausência do inibidor.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 LIQUORES

Os liquores foram cedidos pela doutora Caroline Damo, que realizou um projeto de pós-doutorado em parceria com a Novozymes Latin America utilizando bagaço de cana-de-açúcar de uma usina sucroalcooleira localizada no interior de São Paulo. Neste projeto, o material foi submetido ao processo de explosão a vapor no laboratório do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná, em um reator de aço inox com capacidade de 10 litros, a 180°C durante 10 minutos, com e sem impregnação prévia de ácido sulfúrico (2% m/m, em base seca de material). O material foi armazenado em geladeira, a 4°C. O liquor gerado sem a impregnação de ácido recebeu a denominação de “auto hidrólise”, e o liquor que passou por uma impregnação prévia de ácido sulfúrico foi denominado de “hidrólise ácida”.

### 5.2 CEPAS DE LEVEDURAS

Três cepas de leveduras *S. cerevisiae* foram cedidas pelo departamento de Pesquisa e Desenvolvimento da Novozymes Latin America para o desenvolvimento deste estudo, a saber:

- CAT-1
- PE-2
- SA-1

Todas as cepas são comercializadas pela empresa LNF. As cepas CAT-1 e PE-2 foram selecionadas pela empresa de consultoria e pesquisa Fermentec, e a cepa SA-1 foi isolada pelo CTC (Centro de Tecnologia Canavieira). As cepas foram selecionadas após anos de pesquisas e testes para avaliar as qualidades fermentativas e sua persistência no processo fermentativo com reciclo de biomassa. CAT-1 foi isolada da Usina Virgolino de Oliveira de Catanduva, SP; PE-2 foi originalmente obtida na área da Usina da Pedra, em Serrana (SP); SA-1 é proveniente da Usina Santa Adélia, na cidade de Jaboticabal (SP) (ANDRIETTA et al, 2011).



As cepas foram cultivadas em meio YPD e estocadas com 20% de glicerol a -80°C, em *vials* contendo 1 mL de suspensão de células.

### 5.3 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Os compostos selecionados para as análises realizadas ao longo deste trabalho foram analisados e tiveram suas concentrações determinadas através de métodos de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a saber:

- Ácido acético, glicose, xilose glicerol e etanol: a análise foi feita em Cromatógrafo a Líquido de Alta Eficiência (Agilent modelo 1200) equipado com coluna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm, partícula 9 µm, Bio-Rad, Hercules, Estados Unidos) e pré-coluna Micro-Guard Cátion H (30 x 4,6 mm, Bio-Rad, Hercules, Estados Unidos), eluídos a 65°C sob vazão de 0,6 mL/min de fase móvel (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mmol/L) para 10 µL de volume de injeção e um tempo total de corrida de 30 minutos. A detecção foi realizada por índice de refração (50°C).
- Ácidos orgânicos (oxálico, fórmico, levulínico e aconítico): a análise foi feita em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (Agilent modelo 1200) equipado com coluna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm, partícula 9 µm, Bio-Rad, Hercules, Estados Unidos) e pré-coluna Micro-Guard Cátion H (30 x 4,6 mm, Bio-Rad, Hercules, Estados Unidos), eluídos a 30°C sob vazão de 0,6 mL/min de fase móvel (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mmol/L) para 10 µL de volume de injeção e um tempo total de corrida de 25 minutos. A detecção foi realizada por índice de refração (50°C).
- Furfural, HMF, e compostos fenólicos (ácido gálico, ácido 4-hidroxibenzóico, 4-hidroxibenzaldeído, ácido vanílico, ácido cafeico, 3- hidroxibenzaldeído, vanilina, ácido *p*-cumárico, ácido *o*-cumárico e ácido ferúlico): a análise foi feita por um método cromatográfico utilizando eluição gradiente com 2 componentes de fase móvel: (A) ácido fórmico 2% e (B) metanol, em um cromatógrafo a líquido Agilent 1200. A coluna utilizada foi a LUNA C18 (Phenomenex) e sua pré-coluna correspondente, ambas ambientadas a 20°C. A vazão utilizada foi de 0,8 mL/min para 10 µL de volume de injeção, 60 minutos de tempo total de corrida e 5 minutos de pós-corrida para restauração da condição inicial. O gradiente iniciou com 95% de A,

alcançando 85% aos 32 minutos, 40% em 48 minutos e 20% em 60 minutos. O eluato da coluna foi monitorado utilizando um detector de absorção no ultra violeta em três comprimentos de onda distintos: 265, 280 e 305 nm.

## 5.4 MEIOS DE CRESCIMENTO E CULTIVO

### 5.4.1 Meio de multiplicação

O meio de multiplicação utilizado ao longo do desenvolvimento do projeto foi o meio sintético YPD tradicional, contendo (g/L): glicose (20,0), peptona (20,0) e extrato de levedura (10,0). O meio foi esterilizado em autoclave a 121°C e 20 minutos.

### 5.4.2 Meios de cultivo para cinética de crescimento de *S. cerevisiae*

Os meios de cultivo utilizados eram sintéticos ou tinham por base os líquidos fornecidos, e são listados a seguir:

1. YPD - contendo (g/L): glicose (20,0), peptona (10,0) e extrato de levedura (5,0). O pH foi ajustado para 5,0 com uma solução de ácido sulfúrico 1M e o meio foi esterilizado em autoclave a 121°C e 20 minutos.
2. Auto hidrólise – líquido “auto hidrólise” adicionado de D-glicose até concentração final de 20 g/L. A suplementação foi definida a partir da concentração de glicose já existente, determinada na etapa de caracterização por métodos cromatográficos. A fim de evitar que um possível efeito inibitório no crescimento das leveduras decorresse por deficiência nutricional e não apenas pelas concentrações de compostos inibidores, o líquido também foi suplementado com 10,0 g/L de peptona e 5,0 g/L de extrato de levedura. O pH foi ajustado para 5,0 através da adição de pastilhas de hidróxido de potássio (KOH).
3. Hidrólise ácida - líquido “hidrólise ácida” suplementado com D-glicose dissolvida diretamente no meio para concentração final de 20 g/L. A suplementação foi definida a partir da concentração de glicose já existente, determinada na etapa de caracterização por métodos cromatográficos. O líquido também foi suplementado com

10,0 g/L de peptona e 5,0 g/L de extrato de levedura. O pH foi ajustado para 5,0 através da adição de pastilhas de hidróxido de potássio (KOH).

#### 5.4.3 Meios de cultivo para o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Os meios de cultivo utilizados no Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) tinham por base o meio sintético YPD, contendo (g/L): glicose (20,0), peptona (10,0) e extrato de levedura (5,0). Este meio foi então suplementado com ácido acético, HMF e furfural nas concentrações definidas pelo planejamento experimental, a partir de soluções-mãe de 60 g/L de ácido acético, 20 g/L de furfural e 10 g/L de HMF, totalizando 15 meios de cultivo diferentes (Tabela 3). Cada um dos meios teve seu pH ajustado para 5,0 com soluções de hidróxido de potássio ou ácido sulfúrico 1M. Nesta etapa, optou-se pela esterilização por filtração (0,22  $\mu$ m), para evitar que o aquecimento em autoclave pudesse modificar os compostos adicionados ao YPD.

#### 5.4.4 Meios de cultivo para evolução adaptativa de *S. cerevisiae*

Nesta etapa, os meios foram compostos por YPD, constituído por (g/L): glicose (40,0), peptona (10,0), extrato de levedura (5,0) e furfural em concentrações variáveis, adicionados a partir de uma solução-mãe de 20 g/L. Todos os valores de pH foram ajustados para 5,0 com soluções de hidróxido de potássio ou ácido sulfúrico 1M e esterilizados por filtração (0,22  $\mu$ m).

### 5.5 PREPARO DE INÓCULOS

Para obter os inóculos das estirpes de levedura os tubos contendo 1 mL de suspensão de leveduras em 20% de glicerol e armazenados a -80°C foram retirados do *ultrafreezer* e descongelados a temperatura ambiente. O conteúdo destes tubos foram transferidos para um erlenmeyer de 125 mL com chicanas, contendo 40 mL do meio de multiplicação descrito na seção 5.4.1. As culturas foram então incubadas a 32°C e 150 rpm, durante 18 horas.

## 5.6 DETERMINAÇÃO DE VIABILIDADE CELULAR

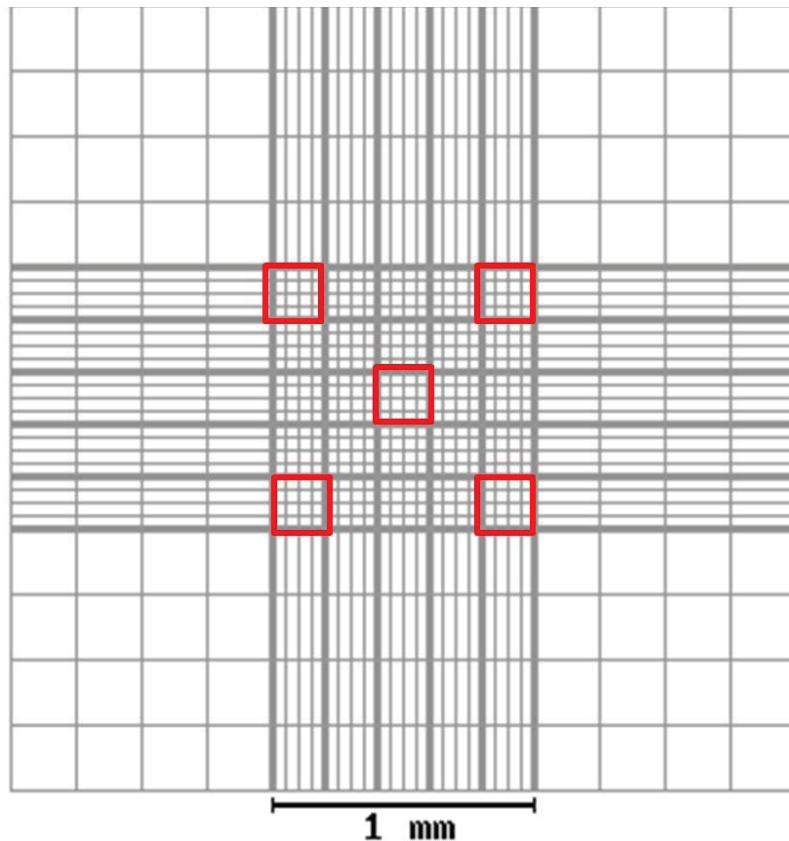
A viabilidade celular das leveduras foi determinada através de coloração diferencial pela solução de vermelho de eritrosina em tampão fosfato, de acordo com a metodologia descrita por OLIVEIRA e colaboradores (1996).

Nesta coloração diferencial, as células viáveis permanecem incolores, enquanto as células não viáveis são coradas de róseo intenso, devido ao comprometimento da membrana celular que permite a absorção do corante pela célula.

As suspensões de células foram apropriadamente diluídas em água destilada e a contagem foi realizada em microscópio óptico Zeiss (modelo Primo-Star), com auxílio de uma câmara de Neubauer. Foram contadas as células viáveis e não viáveis contidas em 5 quadrantes da câmara, cada qual com um volume de  $4 \cdot 10^{-6}$  mL, em um aumento de 400x. Os quadrantes considerados para contagem estão indicados na Figura 7.

Os resultados foram expressos em porcentagem de células viáveis calculados pela seguinte fórmula:

$$Viabilidade (\%) = \frac{\text{número de células viáveis}}{\text{número de células totais}} \times 100$$



**Figura 7** – Esquema representando os 5 quadrantes considerados para contagem em câmara de Neubauer (destacados em vermelho)

## 5.7 CINÉTICA DE CRESCIMENTO DAS ESTIRPES DE *S. CEREVISIAE*

### 5.7.1 Determinação da relação massa seca x densidade óptica

Previamente ao estudo de cinética de crescimento celular, as três linhagens de leveduras, provenientes do banco de microrganismos do departamento de Pesquisa e Desenvolvimento da Novozymes Latin America, foram caracterizadas quanto à relação entre massa seca e densidade óptica a um comprimento de onda de 600 nm.

Ao final das 18 horas da etapa de multiplicação, 10 mL foram filtrados em membranas de acetato de celulose 0,22  $\mu\text{m}$  e a massa de células foi lavada por três vezes com um volume de 10 mL de água destilada.

Antes desta etapa de filtração, todas as membranas passaram por um processo de secagem em um analisador de umidade Mettler Toledo, modelo HB-

43S, a 160°C e tiveram suas massas determinadas em balança analítica. Após a filtração, o mesmo processo de secagem foi repetido. A massa seca foi determinada utilizando uma balança analítica após secagem. As densidades ópticas de diluições sucessivas do cultivo foram medidas em um espectrofotômetro Thermo Scientific Genesys 20, a um comprimento de onda de 600 nm.

O objetivo desta etapa era garantir que todos os cultivos posteriores possuísem exatamente o mesmo inóculo inicial, além de possibilitar a análise dos dados gerados posteriormente em base seca de leveduras.

Os resultados desta etapa, bem como as equações obtidas para cada linhagem, encontram-se no Anexo I.

#### 5.7.2 Cinética de crescimento em líquidos

Para a cinética de crescimento em líquidos, as três linhagens de levedura (CAT-1, PE-2 e SA-1) foram cultivadas em meio YPD como descrito acima.

Os três meios de cultivo preparados para a etapa de avaliação cinética foram inoculados com 0,5 g/L de células em massa seca, sendo que o volume total de meio de cultivo foi de 30 mL, em erlenmeyers chicanados de 125 mL. A fim de evitar que um excesso de nutrientes do inóculo fosse carregado para o cultivo principal, as células foram centrifugadas e o *pellet* formado foi então suspenso no próprio meio de cultivo. O crescimento ocorreu a uma temperatura de 32°C e agitação de 150 rpm durante 12 horas. Além disso, um frasco controle de cada meio de cultivo também foi incubado nas mesmas condições sem inoculação. As cinéticas de crescimento celular foram acompanhadas a cada 2 h por amostragens de 1 mL de cultivo, incluindo o tempo inicial, totalizando 7 pontos de amostragem. Cada amostra foi analisada quanto aos seguintes parâmetros:

- Densidade óptica a 600 nm: a fim de estimar a biomassa seca utilizando a curva de calibração previamente determinada. Os controles sem inóculo de células foram utilizados como branco para cada ponto de amostragem.
- Análises em cromatografia líquida: já descritas na seção 5.3, para monitoramento do consumo de açúcares, produção de metabólitos e detoxificação do meio. Os controles sem inóculo de células também foram analisados.

Cada condição foi avaliada em duplicata, exceto os controles sem inóculo de células, de forma que o planejamento experimental pode ser resumido de acordo com a Tabela 2.

**Tabela 2** - Desenho experimental da cinética de crescimento

Linhagem		Meio de cultivo	
<b>CAT-1</b>	YPD	Auto hidrólise	Hidrólise ácida
<b>PE-2</b>	YPD	Auto hidrólise	Hidrólise ácida
<b>SA-1</b>	YPD	Auto hidrólise	Hidrólise ácida
<b>sem inóculo</b>	YPD*	Auto hidrólise*	Hidrólise ácida*

\*não foi realizado em duplicata, somente um frasco

Os parâmetros calculados foram: o fator de conversão de substrato em células ( $Y_{X/S}$ ), o fator de conversão de substrato em produto, ou seja, etanol ( $Y_{P/S}$ ), e a produtividade volumétrica do produto ( $Q_P$ ). Todos estes parâmetros referem-se ao ponto final, ou seja, após 12 horas de cultivo. Estes parâmetros foram calculados da seguinte forma:

$$Y_{X/S} = (X - X_0)/(S_0 - S)$$

Onde:

- $X_0$  = concentração celular inicial (g/L);
- $X$  = concentração celular ao final de 12 horas (g/L);
- $S_0$  = concentração inicial de substrato – glicose (g/L);
- $S$  = concentração de substrato ao final de 12 horas (g/L).

$$Y_{P/S} = (P - P_0)/(S_0 - S)$$

Onde:

- $P_0$  = concentração de produto – etanol - inicial (g/L);
- $P$  = concentração de produto ao final de 12 horas (g/L);
- $S_0$  = concentração inicial de substrato – glicose (g/L);
- $S$  = concentração de substrato ao final de 12 horas (g/L).

$$Q_P = (P - P_0)/t$$

Onde:

- $P_0$  = concentração de produto – etanol - inicial (g/L);
- $P$  = concentração de produto ao final de 12 horas (g/L);
- $t$  = tempo de cultivo (para efeitos de cálculo, foi definido o tempo de 6 horas, que corresponde ao tempo em que a glicose foi completamente consumida, conforme gráficos apresentados na seção de Resultados e Discussão).

Além disso, ao final de 12 horas, todos os cultivos tiveram sua viabilidade celular analisada conforme descrito na seção 5.6.

## 5.8 EFEITOS DO ÁCIDO ACÉTICO, HMF E FURFURAL NO CRESCIMENTO CELULAR

Com base nas concentrações máximas de cada inibidor identificado nos dois tipos de licores, foi planejado um ensaio seguindo a estratégia de planejamento experimental DCCR (Desenho Central Composto Rotacional) com duas repetições do ponto central, sendo que as três variáveis independentes deste desenho foram as concentrações de furfural, HMF e ácido acético. Este tipo de planejamento experimental consiste em um planejamento fatorial  $2^3$  com oito ensaios ( $2 \times 2 \times 2$ ), mais seis pontos axiais e dois pontos centrais, totalizando dezesseis combinações de concentrações dos 3 compostos para cada estirpe de levedura. O experimento foi desenhado com o auxílio do *software* JMP 12 e está detalhado na Tabela 3, de forma que os pontos centrais (representados pelo padrão 000) fossem correspondentes à metade da concentração mais alta do inibidor encontrada na etapa de caracterização dos licores.

Para a concentração final de cada composto no meio (ácido acético, HMF e furfural) foi atribuído um nível crescente determinado pelos símbolos “a”, “-“, “0”, “+” e “A”, sendo que “a” corresponde à concentração mínima determinada (isto é, ausência do composto) e “A” corresponde à concentração máxima informada ao *software* para a obtenção do planejamento experimental. Desta forma, “0” refere-se ao ponto central e os níveis “-“ e “+” são pontos intermediários entre o ponto central e os extremos mínimo e máximo, respectivamente, determinados a partir das



características do experimento. Sendo assim, o padrão apresentado na primeira coluna da Tabela 3 é definido como a combinação dos níveis de cada um dos três compostos.

**Tabela 3** - Desenho Central Composto Rotacional (DCCR) para determinação de efeito de inibidores de liquor no cultivo das linhagens de levedura

<b>Padrão</b>	<b>Ácido acético (g/L)</b>	<b>HMF (g/L)</b>	<b>Furfural (g/L)</b>
---	1,09	0,30	1,01
--+	1,09	0,30	3,99
-+-	1,09	1,20	1,01
-++	1,09	1,20	3,99
+--	4,31	0,30	1,01
+-+	4,31	0,30	3,99
++-	4,31	1,20	1,01
+++	4,31	1,20	3,99
a00	0,00	0,75	2,50
A00	5,41	0,75	2,50
0a0	2,70	0,00	2,50
0A0	2,70	1,51	2,50
00a	2,70	0,75	0,00
00A	2,70	0,75	5,01
000	2,70	0,75	2,50
000	2,70	0,75	2,50

Os níveis de cada composto dos padrões estão apresentados na seguinte ordem: ácido acético, HMF e furfural.

O volume de trabalho nesta etapa foi de 3 mL, e os cultivos foram feitos em tubos de 50 mL do tipo Falcon, modelo mini-biorreator. Trata-se de um tubo convencional do tipo Falcon que possui uma tampa que permite a liberação de gases gerados ao longo do crescimento celular.

Após a etapa de multiplicação celular, cada frasco foi inoculado com 0,5 g/L de célula em massa seca, de acordo com a curva estabelecida conforme o descrito na seção 5.7.1 e incubado a 32°C e 150 rpm durante 48 horas. Os frascos foram amostrados nos pontos de 12, 24 e 48 horas para avaliação do crescimento celular através de leitura da densidade óptica a 600 nm em um espectrofotômetro Thermo Scientific Genesys 20, que foi posteriormente convertida em massa seca.

A análise dos dados estatísticos foi feita com o auxílio do *software* JMP 12, com limite de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ).

Ao final de 48 horas, cada cultivo teve também sua viabilidade celular avaliada.

## 5.9 ADAPTAÇÃO EVOLUTIVA

Nesta etapa, a estirpe CAT-1 foi selecionada como ponto de partida para obtenção de uma linhagem mais resistente aos inibidores estudados neste trabalho. Os motivos que levaram a seleção da linhagem CAT-1 serão apresentados na seção de Resultados e Discussão.

### 5.9.1 Determinação do estresse inicial imposto

A fim de determinar a concentração inicial de inibidores para ser utilizada no processo de adaptação evolutiva, foi realizado um ensaio em que a concentração de furfural variou de 0,0 a 6,5 g/L, numa escala de 0,5 g/L, totalizando 14 frascos. O motivo por se ter selecionado apenas o furfural para prosseguimento dos experimentos de adaptação evolutiva será apresentado na seção de Resultados e Discussão.

O volume de trabalho nesta etapa foi de 3 mL, e os cultivos foram feitos em tubos de 50 mL do tipo Falcon, modelo biorreator. Após uma etapa de multiplicação, cada um dos 14 frascos continha o meio de cultivo YPD descrito na seção 5.4.4 contendo concentrações crescentes de furfural.

Cada frasco foi inoculado com 0,1 g/L de célula em massa seca, de acordo com a curva estabelecida conforme o descrito na seção 5.7.1 e incubado a 32°C e 150 rpm durante 24 horas. Após 24 horas, os cultivos tiveram sua massa seca de células determinadas através da leitura de densidade óptica a um comprimento de onda de 600 nm em um espectrofotômetro Thermo Scientific Genesys 20.

### 5.9.2 Obtenção de estirpe resistente ao liquor por adaptação evolutiva

A engenharia evolutiva da estirpe de *S. cerevisiae* CAT-1 foi realizada através de re-inoculações sequenciais de cultivos na presença de furfural para meio novo contendo concentrações maiores de furfural até se atingir 6,5 g/L.

O volume de trabalho foi de 3 mL, e as bateladas foram feitas em tubos de 50 mL do tipo Falcon, modelo biorreator, contendo os meios de cultivo descritos na seção 5.4.4, acrescidos de furfural em concentração crescente, dependendo da etapa de transferência. Estas concentrações serão explicitadas e discutidas na seção de Resultados e Discussão.

Diferentemente da etapa anterior, a cada transferência os frascos foram inoculados com 0,5 g/L de célula em massa seca, de acordo com a curva estabelecida conforme o descrito na seção 5.7.1, de forma a aumentar a probabilidade de se obter uma linhagem variante mais resistente. Cada batelada foi incubada a 32°C e 150 rpm, e a cada 24 ou 48 horas a cultura era usada como inóculo para um novo meio com concentração maior de furfural.

A cada transferência, o volume de inóculo necessário era calculado para conter 0,5 g/L em massa seca, coletado, centrifugado, e as células suspensas no meio novo.

Ao longo do processo de transferências, alguns estoques foram feitos da seguinte maneira: as células eram transferidas para um meio de multiplicação e cultivadas por 24 horas. Após 24 horas de cultivo, adicionava-se glicerol (concentração final 20%) esterilizado e a suspensão era armazenada em *ultrafreezer* a -80°C.

### 5.9.3 Avaliação das estirpes obtidas

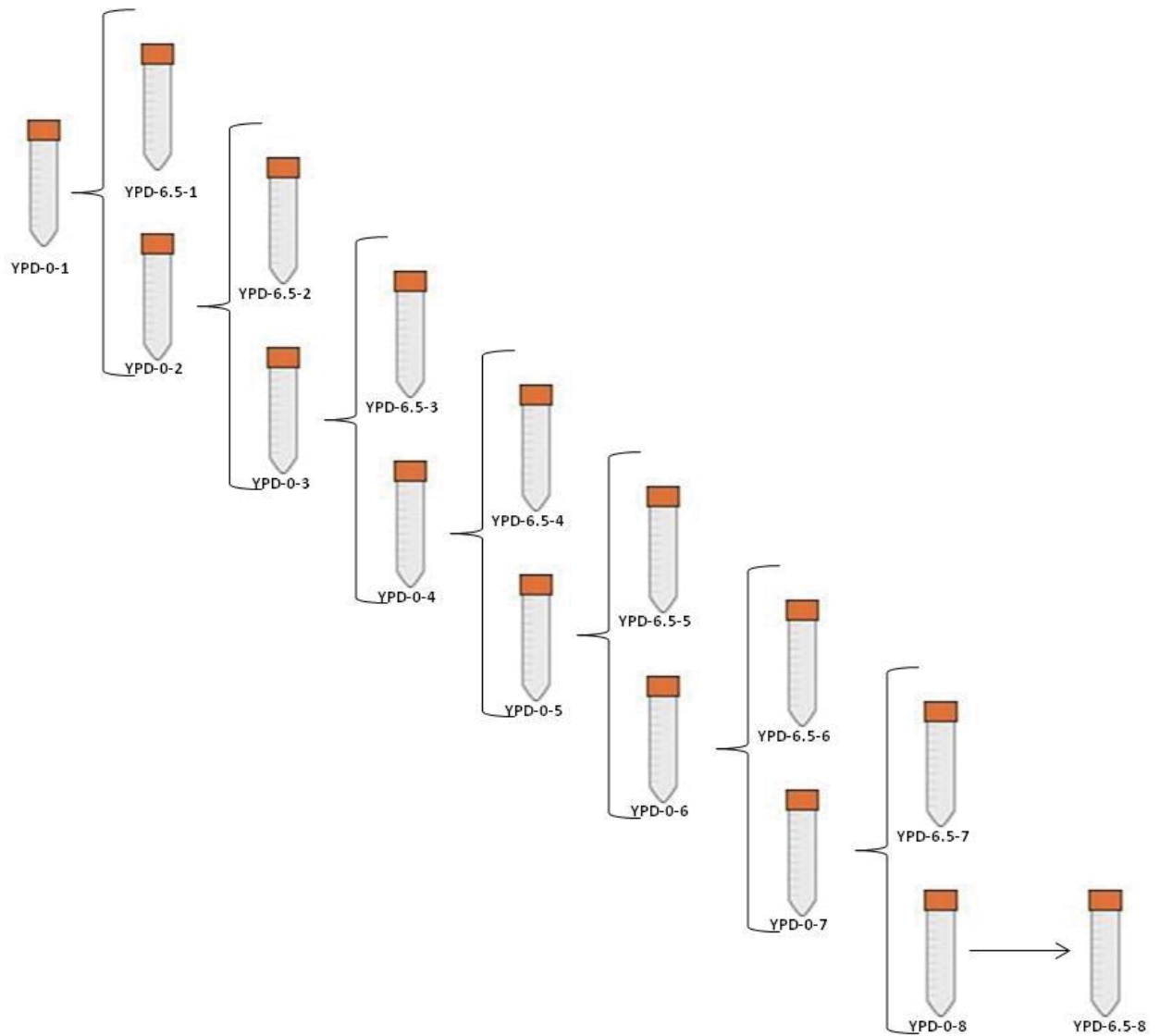
Para avaliar a eficiência da engenharia evolutiva, foi realizado um ensaio em que os estoques a -80°C foram reativados, ou seja, passaram por uma etapa de multiplicação no meio descrito na seção 5.4.1.

Após a reativação, os frascos do tipo Falcon modelo mini-biorreator de 50 mL contendo 3 mL de YPD e 6,5 g/L de furfural foram inoculados com 0,5 g/L de célula em massa seca e incubados a 32°C e 150 rpm por 72 horas, com amostragens a cada 24 horas para leitura de densidade óptica a 600 nm. Como controle, também foi avaliada a estirpe parental (CAT-1).

Para avaliar a performance da estirpe selecionada frente aos líquidos estudados, ela foi submetida a uma análise de cinética de crescimento, para que pudesse ser comparada à sua linhagem parental CAT-1 (seção 5.7.2).

Adicionalmente, para avaliar se a engenharia evolutiva causou uma mutação na estirpe obtida e não apenas uma adaptação epigenética, foi desenhado um experimento em que a estirpe selecionada passou por oito transferências em meio YPD sem qualquer adição de inibidor e, ao longo das transferências, eram submetidas a 6,5 g/L de furfural.

O ensaio foi conduzido da seguinte maneira: a estirpe selecionada foi cultivada em meio YPD sem inibidores (YPD-0) a 32°C e 150 rpm durante 18 horas. Após este cultivo, 0,5 g/L de células em massa seca foram inoculadas em meio YPD contendo 6,5 g/L de furfural (YPD-6.5) e incubados a 32°C e 150 rpm durante 72 horas, com amostragens a cada 24 horas para medida da densidade óptica a 600 nm. O mesmo cultivo em YPD foi inoculado (0,5 g/L de células em massa seca) em novo meio YPD sem inibidores e cultivados por mais 18 horas. Assim ocorreu sucessivamente durante 8 bateladas. Como controle, a estirpe parental CAT-1 foi submetida a uma batelada para efeitos de comparação. Todo o ensaio foi conduzido em volumes de 3 mL, em tubos de 50 mL do tipo Falcon modelo mini-biorreator. A Figura 8 ilustra a estratégia experimental de forma mais simplificada.



**Figura 8** - Estratégia experimental para avaliação da engenharia evolutiva. YPD-0 refere-se ao meio com ausência de furfural e YPD-6.5 refere-se ao meio contendo 6,5 g/L de furfural. Os números adicionados após estas siglas representam o número da batelada.

#### 5.9.4 Número de gerações

Para definir o número de gerações na etapa de engenharia evolutiva, utilizou-se a seguinte equação, que se aplica a microrganismos que se dividem binariamente e com 100% de viabilidade, que é o caso das linhagens de leveduras estudadas:

$$n = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2}$$

Onde:

- $n$  = número de gerações;
- $N$  = número de microrganismos ao final de “ $n$ ” gerações;
- $N_0$  = número de microrganismos no início do cultivo.

Uma vez que  $N$  e  $N_0$  são determinados em número de células / mL, foi necessário estabelecer uma relação entre a densidade óptica medida a 600 nm e o número de células presentes no cultivo.

Para isso, o cultivo denominado YPD-0-1, na Figura 8, foi diluído seriadamente. Cada diluição teve sua densidade óptica determinada a 600 nm em um espectrofotômetro Thermo Scientific Genesys 20.

A contagem de células foi realizada em microscópio óptico (microscópio Zeiss – Primo Star), com auxílio de uma câmara de Neubauer. Para cada diluição, foram contadas as células contidas em 5 quadrantes da câmara (Figura 7), cada qual com um volume de  $4 \cdot 10^{-6}$  mL, em objetiva de 40x. A concentração em células/mL foi calculada da seguinte forma:

$$C = 4 \times 10^{-6} \times m$$

Onde:

- $m$  = média aritmética do número de células contadas;
- $C$  = concentração de células (células/mL).

A curva obtida pode ser encontrada no Anexo II.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS LIQUORES

A Tabela 4 resume a caracterização química realizada e apresenta as concentrações em g/L dos componentes identificados neste trabalho.

**Tabela 4** - Caracterização química dos liquores.

	Auto hidrólise	Hidrólise ácida
Ácido gálico	0,000	0,000
HMF	0,045	1,385
Furfural	0,544	6,371
Ácido 2-furoico	0,031	0,028
Ácido 4-hidroxibenzoico	0,013	0,070
4-hidroxibenzaldeído	0,051	0,046
Ácido vanílico	0,000	0,019
Ácido cafeico	0,000	0,002
3-hidroxibenzaldeído	0,000	0,000
Vanilina	0,036	0,056
Ácido p-cumárico	0,309	0,169
Ácido ferúlico	0,047	0,055
Ácido o-cumárico	0,000	0,000
Ácido oxálico	3,557	0,569
Ácido fórmico	2,638	3,733
Ácido levulínico	0,000	0,750
Ácido aconítico	6,503	2,212
Glicose	0,480	9,708
Xilose	4,065	11,834
Ácido acético	1,778	6,831

Valores apresentados em g/L

A caracterização dos materiais cedidos para estudo corrobora o efeito da severidade do pré-tratamento. Os níveis de concentração do HMF e do furfural foram, respectivamente, de aproximadamente 30 e 10 vezes maiores com a impregnação prévia de ácido sulfúrico. Estes dados contrastam bastante com estudos que relatam um aumento de três vezes na concentração destes compostos após impregnação ácida (SASSNER et al, 2008; MARTÍN et al, 2002; TENGBORG et al, 1998).

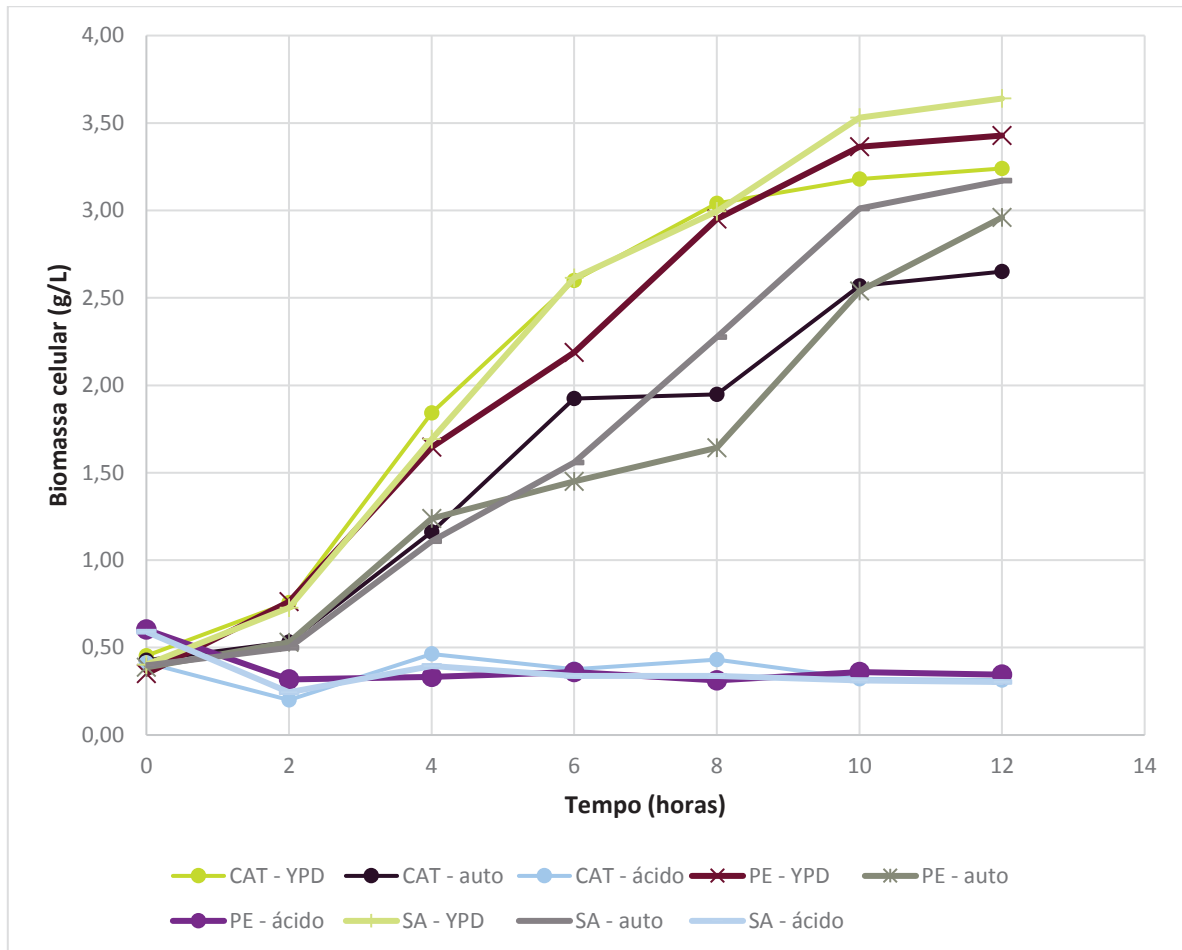
Pode-se inferir que o pré-tratamento de explosão a vapor a que foram submetidos estes materiais não foi ideal, visto que além das altas concentrações de compostos inibidores, os materiais apresentaram também baixos teores de xilose

(4,06 e 11,83 g/L para auto hidrólise e hidrólise ácida, respectivamente). Ao mesmo tempo em que a caracterização aponta para um pré-tratamento ineficiente, as altas concentrações de inibidores criam uma condição que permite a possibilidade de seleção de linhagens mais robustas e tolerantes a partir dos estudos de evolução adaptativa. Além disso, selecionar estirpes já adaptadas para condições mais severas de pré-tratamento pode ser de grande valia já que controlar as condições do pré-tratamento para gerar baixa concentração dos inibidores em grande escala pode ser inviável na prática.

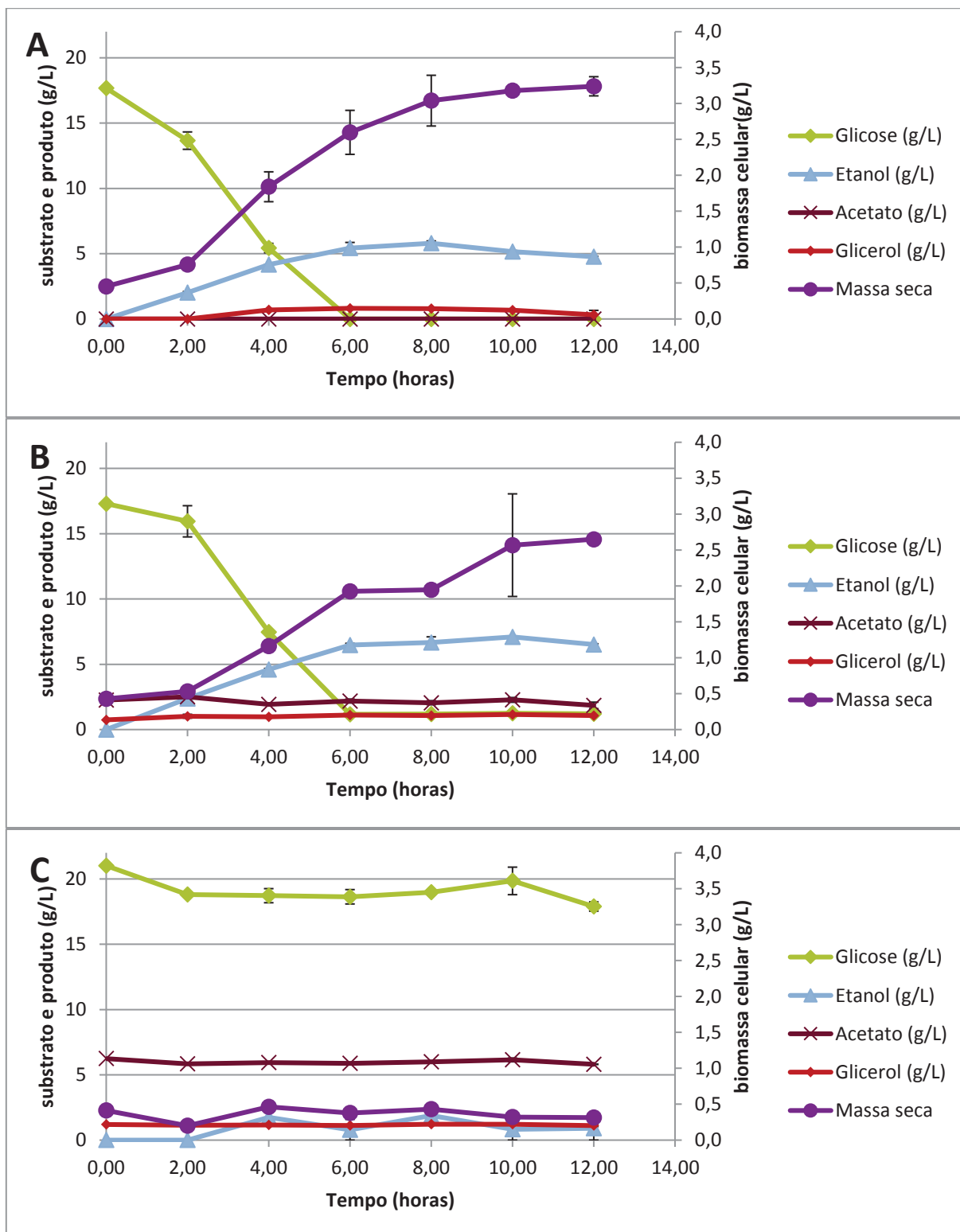
## 6.2 CINÉTICA DE CRESCIMENTO DAS ESTIRPES DE *S. CEREVISIAE*

A Figura 9 representa as cinéticas de crescimento nos meios em que as linhagens CAT-1, PE-2 e SA-1 foram submetidas. O inóculo inicial para todas as condições foi de 0,5 g/L de células em base seca. Nas Figuras 10, 11 e 12, por sua vez, é possível observar as cinéticas de cada linhagem individualmente, acompanhada do consumo de glicose e produção de metabólitos ao longo das 12 horas de cultivo, para cada uma das três condições estudadas, cujas composições dos meios foram descritas na seção 5.4.2

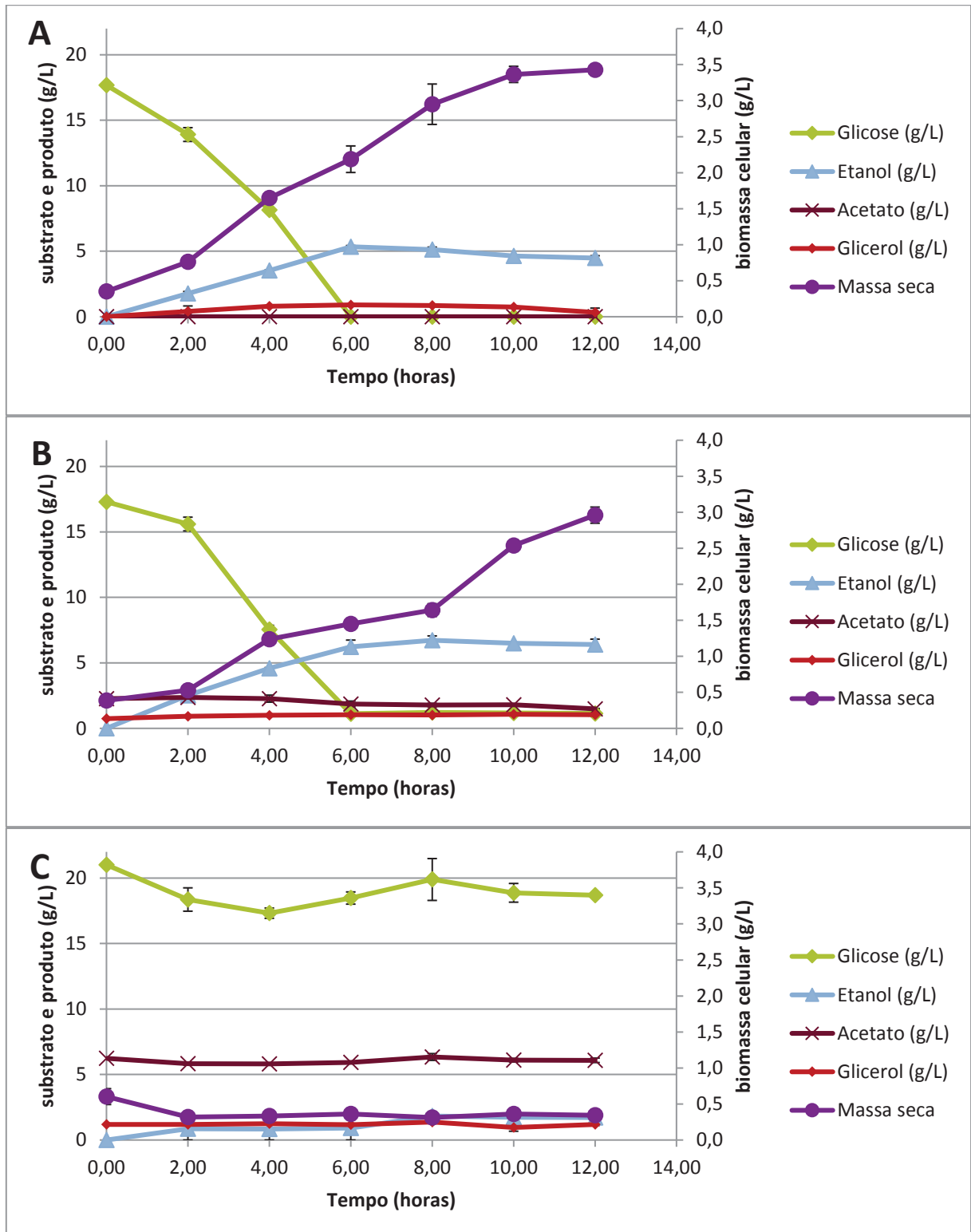




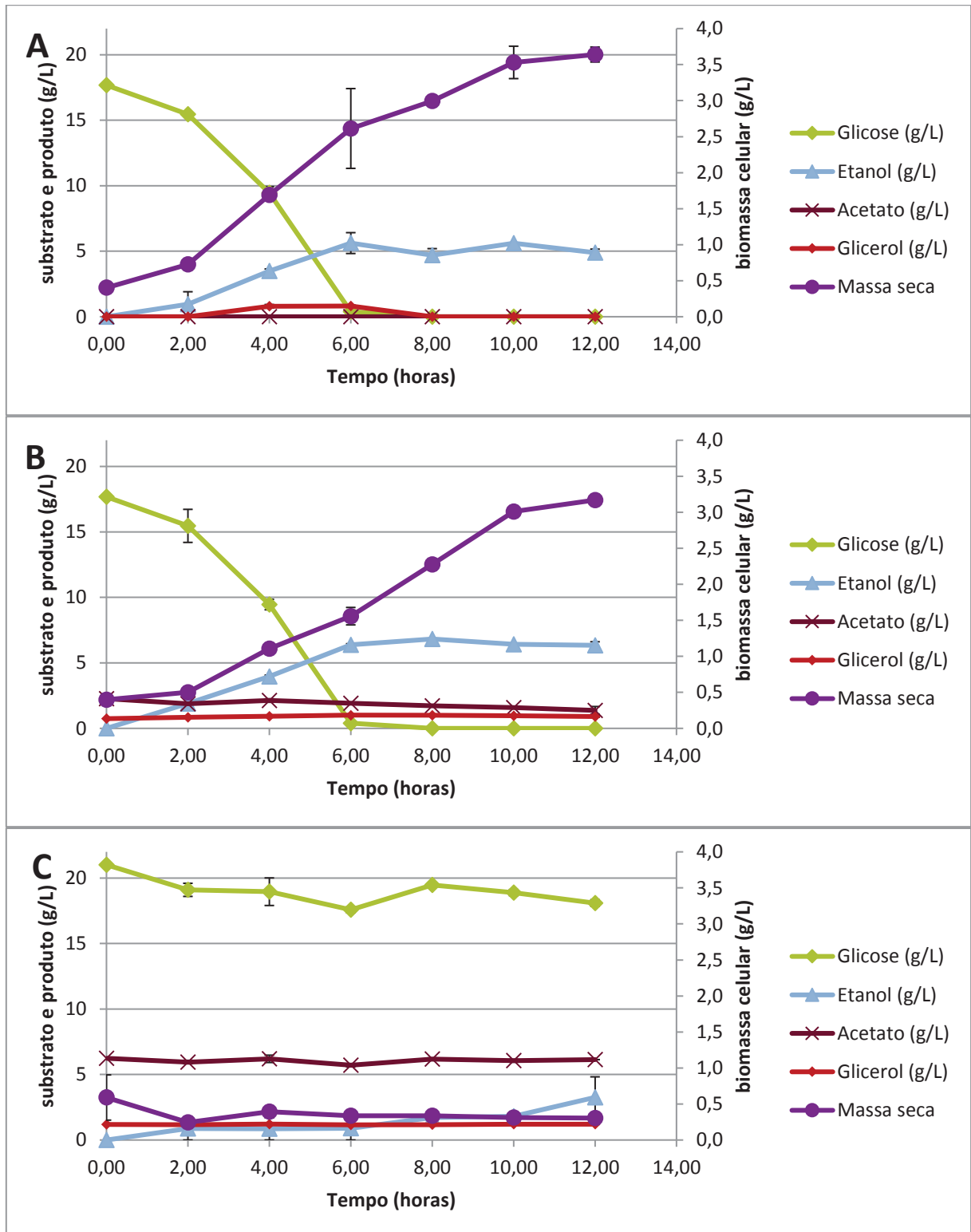
**Figura 9** - Cinética de crescimento das estirpes industriais de *S. cerevisiae* nos liquores e em meio sintético YPD. As abreviações CAT, PE e SA referem-se às estirpes CAT-1, PE-2 e SA-1, respectivamente. As abreviações “YPD”, “auto” e “ácido” referem-se aos meios 1, 2 e 3 descritos na seção 5.4.2, respectivamente



**Figura 10** - Perfis de consumo de açúcar, crescimento celular e produção de metabólitos em meio sintético YPD (A) e nos liquores provenientes do tratamento de auto hidrólise (B) e hidrólise ácida (C) da estirpe CAT-1.



**Figura 11** - Perfis cinéticos de consumo de açúcar, crescimento celular e produção de metabólitos em meio sintético YPD (A) e nos licores provenientes do tratamento de auto hidrólise (B) e hidrólise ácida (C) da estirpe PE-2.



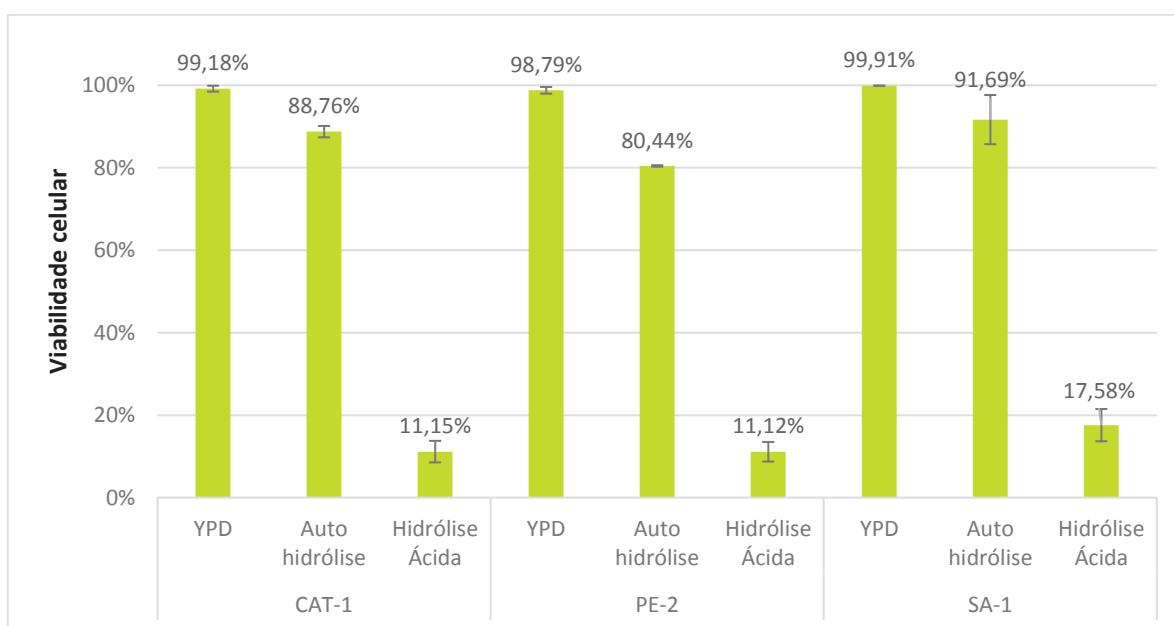
**Figura 12** - Perfis cinéticos de consumo de açúcar, crescimento celular e produção de metabólitos em meio sintético YPD (A) e nos licores provenientes do tratamento de auto hidrólise (B) e hidrólise ácida (C) da estirpe SA-1.

As três estirpes analisadas apresentaram perfis de crescimento bastante semelhantes, de forma que as análises e discussões referentes a esta etapa referem-se sempre a todas as linhagens estudadas.

Pode-se observar que a fase *lag* de crescimento celular no meio sintético YPD, que foi usado como controle e estava livre de inibidores, foi mais rapidamente superada, em comparação ao crescimento no meio denominado “auto hidrólise”, que apresentou um crescimento linear mais lento. Além disso, observa-se que a glicose é completamente consumida no meio YPD, ao passo que no crescimento em auto hidrólise, tem-se uma estagnação do consumo quando a concentração atinge em média 1,2 g/L de glicose. As concentrações de xilose também foram monitoradas através das análises cromatográficas, porém os resultados foram omitidos dos gráficos, já que não houve sinal de consumo de pentoses. Este comportamento já era esperado, visto que não se tratam de estirpes modificadas para este fim.

As altas concentrações de inibidores geradas pelo aumento na severidade do pré-tratamento com a impregnação ácida precedendo ao processo de explosão a vapor impediu que as células de leveduras fossem capazes de crescer neste liquor.

A Figura 13 ilustra os valores de viabilidade celular medidos após 12 horas de cultivo.

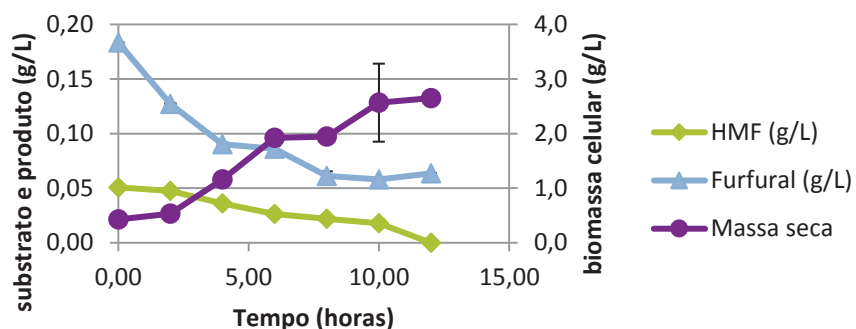


**Figura 13** - Viabilidade celular das linhagens de *S. cerevisiae* CAT-1, PE-2 e SA-1 após 12 horas de cultivo em licores de hidrólise de bagaço de cana de açúcar.

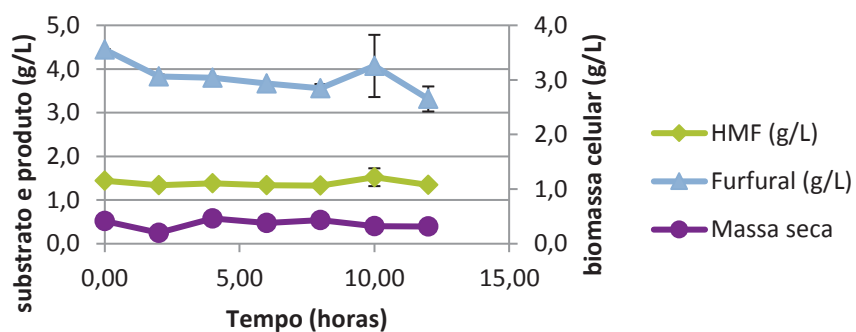
Dessa forma, é possível afirmar que as concentrações de inibidores provenientes no liquor “auto hidrólise” afetam de forma sutil a viabilidade celular das leveduras, o que corrobora com o fato de apresentarem, neste meio, uma fase lag mais estendida que a observada em meio sintético, já que a quantidade de células inoculadas é um fator determinante para a duração da fase lag. Além disso, observa-se que, quando cultivadas na presença de liquor de auto hidrólise, as células são capazes de metabolizar os compostos furanos (HMF e furfural), e entram em crescimento linear a partir do momento em que o furfural atinge uma concentração média de 0,1 g/L, aproximadamente em 4 horas de cultivo (Figura 14). Ou seja, a fase lag mais pronunciada se deve ao fato de que, inicialmente, as células estão direcionando gasto energético para a detoxificação, e quando há um nível tolerável que não apresente toxicidade, elas passam a direcionar o gasto energético para o crescimento e multiplicação. O HMF pode gerar ácido fórmico e levulínico como produtos de quebra, bem como o furfural, sob determinadas condições, também pode levar à formação de ácido fórmico (ALMEIDA et al, 2007). Sendo assim, de forma a garantir que a queda nos níveis de HMF e furfural observadas no liquor “auto hidrólise” de fato correspondiam a uma detoxificação por parte da levedura, e não de uma conversão química natural, este meio foi também incubado sem a adição de qualquer inóculo. Observou-se, então, que as concentrações de HMF e furfural permaneceram constantes ao longo das 12 horas de cultivo (Anexo III).

Já as concentrações presentes no liquor “hidrólise ácida” são capazes de reduzir drasticamente a viabilidade celular, de forma que ao final das 12 horas de cultivo encontram-se, em média, apenas 13% das células do inóculo inicial viáveis. Sendo assim, não há células suficientes para metabolizar uma quantidade tão grande de compostos furanos (Figura 14).

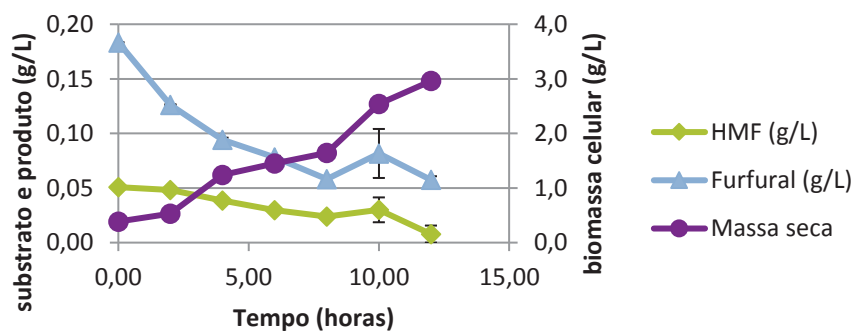
### CAT-1 - Auto hidrólise



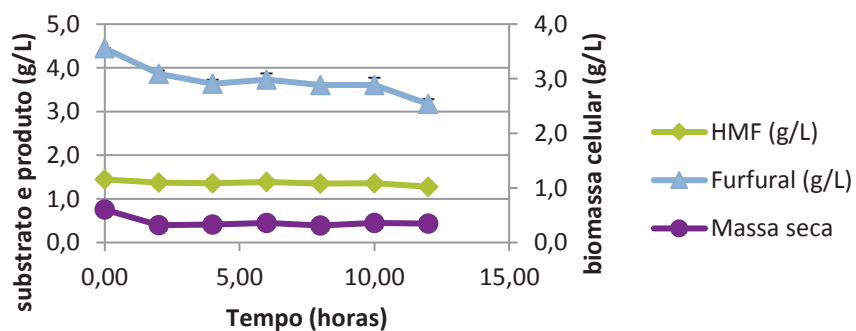
### CAT-1 - Hidrólise ácida

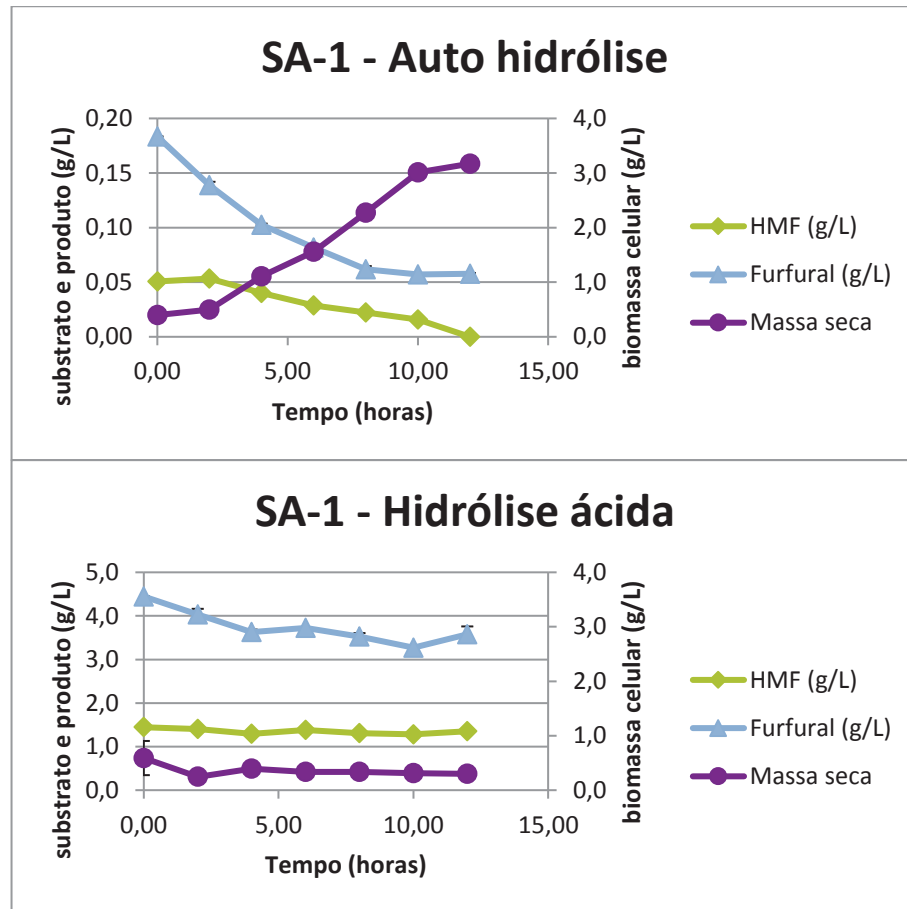


### PE-2 - Auto hidrólise



### PE-2 - Hidrólise ácida





**Figura 14** - Perfis de consumo de furanos nos liquores pelas linhagens CAT-1, PE-2 e SA-1 de *S. cerevisiae*.



Como parâmetros quantitativos, foram calculados o fator de conversão de glicose em células ( $Y_{X/S}$ ), o fator de conversão de substrato em produto, ou seja, etanol ( $Y_{P/S}$ ), e a produtividade volumétrica de etanol ( $Q_P$ ). A Tabela 5 apresenta os valores calculados no meio sintético e no liquor “auto hidrólise”. Todos os parâmetros calculados foram baseados no ponto final da cinética, ou seja, para 12 horas de cultivo. Eles não foram calculados para a condição de hidrólise ácida pelo fato de não haver crescimento celular.

**Tabela 5** – Parâmetros calculados para o cultivo de 12 horas das linhagens CAT-1, PE-2 e SA-1 em YPD e liquor auto hidrólise.

	$Y_{X/S}$	$Y_{P/S}$	$Q_P$ (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
<b>CAT-1 - YPD</b>	0,158 ± 0,104	0,270 ± 0,001	0,905 ± 0,002
<b>CAT-1 - auto hidrólise</b>	0,138 ± 0,000	0,404 ± 0,004	1,079 ± 0,005
<b>PE-2 - YPD</b>	0,174 ± 0,030	0,253 ± 0,010	0,890 ± 0,015
<b>PE-2 - auto hidrólise</b>	0,159 ± 0,094	0,396 ± 0,026	1,037 ± 0,034
<b>SA-1 - YPD</b>	0,183 ± 0,104	0,277 ± 0,015	0,937 ± 0,022
<b>SA-1 - auto hidrólise</b>	0,171 ± 0,026	0,392 ± 0,017	1,064 ± 0,022

“YPD”, “auto hidrólise” referem-se aos meios 1 e 2 descritos na seção 5.4.2, respectivamente

As condições de cultivo em auto hidrólise apresentaram menor rendimento em células e, por sua vez, foram também as condições que apresentaram maior rendimento e produtividade em etanol. Com relação ao crescimento, houve uma redução significativa no parâmetro  $Y_{X/S}$ , nas condições de auto hidrólise, sendo que a estirpe CAT-1 foi a mais afetada pela presença de inibidores: houve uma redução de 12,7% no parâmetro (de 0,158, no meio YPD, para 0,138). A estirpe SA-1, por sua vez, sofreu menos pelo estresse imposto pela condição de auto hidrólise, de forma que a redução no parâmetro  $Y_{X/S}$ , em comparação com o meio YPD, foi de 6,6%. Por outro lado, quando se atenta para a produtividade volumétrica em etanol ( $Q_P$ ), observa-se que há na verdade um benefício provocado pela concentração de inibidores presente na condição de auto hidrólise. Neste caso, a estirpe SA-1, que foi menos afetada no seu crescimento celular devido à presença de inibidores, também foi a que menos se beneficiou desta condição no que diz respeito ao aumento de produtividade volumétrica, apresentando um aumento de 13,5% neste parâmetro.

CAT-1 e PE-2 apresentaram um aumento percentual de 19,2 e 16,4%, respectivamente.

Sabe-se que em condições aeróbias, como foi o caso deste estudo cinético, ocorre preferencialmente respiração, mas também ocorre fermentação alcoólica. Este desvio é promovido pela repressão por glicose, em que ocorre uma diminuição progressiva na velocidade específica de consumo de O<sub>2</sub>, redução dos componentes da via respiratória e repressão de enzimas que atuam no ciclo dos ácidos tricarboxílicos, conhecido como efeito *crabtree* (POSTMA et al, 1989).

Condições de estresse também são capazes de desviar consideravelmente o consumo da glicose da respiração para a fermentação alcoólica, em condições aeróbicas. HORVÁTH e colaboradores (2003) demonstraram que, quando a capacidade da célula oxidar o furfural se excede, sob condições aeróbicas, ocorre um redirecionamento no metabolismo respiro-fermentativo. Esse redirecionamento leva a uma queda no rendimento da biomassa e induzindo à formação de etanol. Dessa forma, pode-se inferir que a presença de furfural, em determinados níveis, apesar de prejudicar o crescimento celular, poderia ser benéfica para o objetivo econômico da indústria, que seria o de maior produção de etanol.

Quando as concentrações de furfural são muito mais altas que a capacidade de metabolização, no entanto, o crescimento celular fica completamente impedido. Esta observação está em concordância com a ausência de crescimento observada no liquor hidrólise ácida, cujo pré-tratamento foi mais severo e houve a liberação de uma quantidade mais elevada de furfural.

Além disso, há uma combinação de fatores que podem representar condições de estresse para a levedura neste cultivo. Uma vez que o liquor teve seu pH ajustado com pastilhas de KOH adicionadas diretamente ao meio, é possível que haja um acúmulo de potássio neste meio de cultivo. Segundo BASSO e colaboradores (2011), concentrações de potássio, cálcio e magnésio que excedam os requerimentos nutricionais da levedura são capazes de induzir respostas de estresse. Segundo AMORIM (1977), as concentrações adequadas destes nutrientes em um mosto para uma fermentação alcoólica eficiente seriam de 700-800 ppm para o potássio, 120 ppm para o cálcio e 70-200 ppm para o magnésio.

Por isso, além do efeito tóxico dos inibidores no que diz respeito à multiplicação celular que este trabalho se propôs a estudar, é possível observar os efeitos que um fator de estresse pode provocar em relação à produção de etanol. A

fim de determinar os limites de tolerância das linhagens testadas frente ao ácido acético, HMF e furfural e observar seus efeitos na produção de etanol, desenhou-se experimentalmente a etapa que será analisada e discutida na seção seguinte.

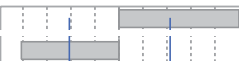

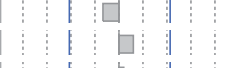
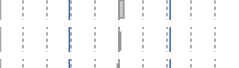





### 6.3 EFEITOS DO ÁCIDO ACÉTICO, HMF E FURFURAL NO CRESCIMENTO CELULAR

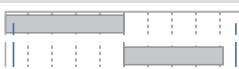


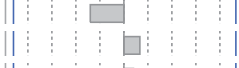




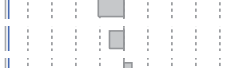
Esta etapa experimental foi realizada com o objetivo de se determinar os efeitos dos três inibidores selecionados para estudo (ácido acético, HMF e furfural), de forma individual e sinérgica. HAALAND (1989) propôs três caminhos para conduzir experimentos de duas ou três variáveis quando se deseja avaliar os efeitos que as variáveis independentes têm sobre as respostas: a Análise Multivariada, matriz com todas as combinações e o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).



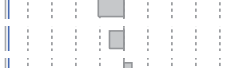


O DCCR, também conhecido como Planejamento Experimental Fatorial, foi selecionado pelo fato de poder ser feito utilizando um número menor de medidas e explorando todo o espaço experimental. Através deste tipo de planejamento, que conta com repetições de ponto central, é possível conhecer a significância estatística das respostas.

A análise estatística dos dados de biomassa celular obtidos através do Desenho Central Composto Rotacional (DCCR), realizada com o auxílio do *software* JMP 12, está compilada nas Tabelas 6, 7 e 8, para as linhagens CAT-1, PE-2 e SA-1, respectivamente.

**Tabela 6** - Análise estatística do efeito de inibidores no crescimento celular resultantes do planejamento experimental DCCR para a estirpe CAT-1, em 12, 24 e 48 horas.










12 horas						
Fatores	Coefficiente	Erro padrão	t <sub>cal</sub>	Gráfico de Pareto	Valor p	
Furfural (g/L)*Furfural (g/L)	0,5241189	0,092479	5,67		0,0008*	
Furfural (g/L)(1,01,3,99)	-0,517789	0,111692	-4,64		0,0024*	
HMF (g/L)*HMF (g/L)	0,2090202	0,09294	2,25		0,0593	
Ácido acético (g/L)*Ácido acético (g/L)	0,1697991	0,092513	1,84		0,1091	
HMF (g/L)(0,3,1,2)	-0,081481	0,111848	-0,73		0,4900	
HMF (g/L)*Furfural (g/L)	0,1027434	0,145861	0,70		0,5039	
Ácido acético (g/L)*HMF (g/L)	0,0375409	0,145861	0,26		0,8043	
Ácido acético (g/L)*Furfural (g/L)	0,0158067	0,145861	0,11		0,9167	
Ácido acético (g/L)(1,09,4,31)	-0,010878	0,111703	-0,10		0,9252	










24 horas						
Fatores	Coefficiente	Erro padrão	t <sub>cal</sub>	Gráfico de Pareto	Valor p	
Furfural (g/L)(1,01,3,99)	-1,24344	0,486768	-2,55		0,0379*	
Ácido acético (g/L)*Ácido acético (g/L)	0,8573499	0,403185	2,13		0,0710	
HMF (g/L)*HMF (g/L)	0,8181753	0,405045	2,02		0,0831	
Furfural (g/L)*Furfural (g/L)	0,7902375	0,403035	1,96		0,0907	
Ácido acético (g/L)(1,09,4,31)	-0,544863	0,486818	-1,12		0,3000	
Ácido acético (g/L)*Furfural (g/L)	0,5058138	0,635683	0,80		0,4523	
HMF (g/L)(0,3,1,2)	-0,356558	0,48745	-0,73		0,4882	
HMF (g/L)*Furfural (g/L)	0,2173419	0,635683	0,34		0,7425	
Ácido acético (g/L)*HMF (g/L)	0,1225018	0,635683	0,19		0,8527	










48 horas						
Fatores	Coefficiente	Erro padrão	t <sub>cal</sub>	Gráfico de Pareto	Valor p	
Furfural (g/L)(1,01,3,99)	-3,402419	1,389642	-2,45		0,0442*	
HMF (g/L)*HMF (g/L)	2,5697631	1,156336	2,22		0,0617	
Ácido acético (g/L)*Ácido acético (g/L)	1,8732004	1,151026	1,63		0,1477	
Furfural (g/L)*Furfural (g/L)	1,075704	1,150598	0,93		0,3810	
Ácido acético (g/L)(1,09,4,31)	-0,737941	1,389785	-0,53		0,6119	
HMF (g/L)(0,3,1,2)	-0,401334	1,39159	-0,29		0,7814	
Ácido acético (g/L)*Furfural (g/L)	0,3270007	1,81477	0,18		0,8621	
HMF (g/L)*Furfural (g/L)	0,2005473	1,81477	0,11		0,9151	
Ácido acético (g/L)*HMF (g/L)	-0,008891	1,81477	-0,00		0,9962	

Coefficiente = resultados expressos para cada combinação de níveis na matriz de planejamento obtido por análise de regressão; t<sub>cal</sub> = valor de influência no processo (estatística do teste); p = probabilidade de significância do teste, a 3 graus de liberdade

**Tabela 7** - Análise estatística do efeito de inibidores no crescimento celular resultantes do planejamento experimental DCCR para a estirpe PE-2, em 12, 24 e 48 horas.




























12 horas						
Fatores	Coefficiente	Erro padrão	t <sub>cal</sub>	Gráfico de Pareto	Valor p	
Furfural (g/L)*Furfural (g/L)	0,5462244	0,077942	7,01		0,0002*	
Furfural (g/L)(1,01,3,99)	-0,539139	0,094135	-5,73		0,0007*	
HMF (g/L)*HMF (g/L)	0,1835582	0,078331	2,34		0,0516	
Ácido acético (g/L)*Ácido acético (g/L)	0,1688688	0,077971	2,17		0,0670	
HMF (g/L)*Furfural (g/L)	0,1592521	0,122933	1,30		0,2363	
HMF (g/L)(0,3,1,2)	-0,101126	0,094267	-1,07		0,3190	
Ácido acético (g/L)*Furfural (g/L)	-0,062491	0,122933	-0,51		0,6268	
Ácido acético (g/L)(1,09,4,31)	0,0353755	0,094145	0,38		0,7182	
Ácido acético (g/L)*HMF (g/L)	-0,014111	0,122933	-0,11		0,9118	

24 horas						
Fatores	Coefficiente	Erro padrão	t <sub>cal</sub>	Gráfico de Pareto	Valor p	
Furfural (g/L)(1,01,3,99)	-1,413421	0,384903	-3,67		0,0079*	
Furfural (g/L)*Furfural (g/L)	0,9423632	0,318693	2,96		0,0212*	
Ácido acético (g/L)*Ácido acético (g/L)	0,8759442	0,318811	2,75		0,0286*	
HMF (g/L)*HMF (g/L)	0,6504772	0,320282	2,03		0,0818	
HMF (g/L)(0,3,1,2)	-0,425303	0,385443	-1,10		0,3063	
HMF (g/L)*Furfural (g/L)	0,2721398	0,502655	0,54		0,6050	
Ácido acético (g/L)(1,09,4,31)	-0,191559	0,384943	-0,50		0,6340	
Ácido acético (g/L)*Furfural (g/L)	0,1390936	0,502655	0,28		0,7900	
Ácido acético (g/L)*HMF (g/L)	0,0020159	0,502655	0,00		0,9969	

48 horas						
Fatores	Coefficiente	Erro padrão	t <sub>cal</sub>	Gráfico de Pareto	Valor p	
Furfural (g/L)(1,01,3,99)	-3,392774	1,262018	-2,69		0,0312*	
Ácido acético (g/L)*Ácido acético (g/L)	2,3053083	1,045317	2,21		0,0632	
HMF (g/L)*HMF (g/L)	2,0675256	1,050139	1,97		0,0896	
Furfural (g/L)*Furfural (g/L)	1,1154154	1,044928	1,07		0,3212	
HMF (g/L)(0,3,1,2)	-0,270631	1,263788	-0,21		0,8365	
Ácido acético (g/L)(1,09,4,31)	-0,2023	1,262149	-0,16		0,8772	
Ácido acético (g/L)*HMF (g/L)	-0,073579	1,648104	-0,04		0,9656	
HMF (g/L)*Furfural (g/L)	-0,067531	1,648104	-0,04		0,9685	
Ácido acético (g/L)*Furfural (g/L)	0,0070555	1,648104	0,00		0,9967	

Coefficiente = resultados expressos para cada combinação de níveis na matriz de planejamento obtido por análise de regressão; t<sub>cal</sub> = valor de influência no processo (estatística do teste); p = probabilidade de significância do teste, a 3 graus de liberdade

**Tabela 8** - Análise estatística do efeito de inibidores no crescimento celular resultantes do planejamento experimental DCCR para a estirpe SA-1, em 12, 24 e 48 horas.

12 horas						
Fatores	Coeficiente	Erro padrão	t <sub>cal</sub>	Gráfico de Pareto	Valor p	
Furfural (g/L)*Furfural (g/L)	0,6540602	0,098252	6,66		0,0003*	
Furfural (g/L)(1,01,3,99)	-0,635986	0,118664	-5,36		0,0011*	
HMF (g/L)*HMF (g/L)	0,1692079	0,098742	1,71		0,1303	
Ácido acético (g/L)*Ácido acético (g/L)	0,1540598	0,098288	1,57		0,1610	
HMF (g/L)*Furfural (g/L)	0,1252234	0,154966	0,81		0,4456	
HMF (g/L)(0,3,1,2)	-0,07974	0,11883	-0,67		0,5237	
Ácido acético (g/L)*Furfural (g/L)	0,096912	0,154966	0,63		0,5516	
Ácido acético (g/L)(1,09,4,31)	-0,057316	0,118676	-0,48		0,6439	
Ácido acético (g/L)*HMF (g/L)	0,0359337	0,154966	0,23		0,8233	
24 horas						
Fatores	Coeficiente	Erro padrão	t <sub>cal</sub>	Gráfico de Pareto	Valor p	
Furfural (g/L)(1,01,3,99)	-1,762797	0,584847	-3,01		0,0195*	
HMF (g/L)*HMF (g/L)	1,0758493	0,486657	2,21		0,0627	
Furfural (g/L)*Furfural (g/L)	1,0563821	0,484243	2,18		0,0655	
Ácido acético (g/L)*Ácido acético (g/L)	0,9692535	0,484423	2,00		0,0855	
Ácido acético (g/L)(1,09,4,31)	-0,289019	0,584907	-0,49		0,6363	
HMF (g/L)(0,3,1,2)	-0,240568	0,585667	-0,41		0,6935	
Ácido acético (g/L)*Furfural (g/L)	0,2940027	0,763767	0,38		0,7117	
HMF (g/L)*Furfural (g/L)	0,1197789	0,763767	0,16		0,8798	
Ácido acético (g/L)*HMF (g/L)	-0,050089	0,763767	-0,07		0,9495	
48 horas						
Fatores	Coeficiente	Erro padrão	t <sub>cal</sub>	Gráfico de Pareto	Valor p	
Furfural (g/L)(1,01,3,99)	-3,870444	1,445735	-2,68		0,0317*	
HMF (g/L)*HMF (g/L)	2,7417087	1,203011	2,28		0,0567	
Ácido acético (g/L)*Ácido acético (g/L)	2,5691228	1,197487	2,15		0,0691	
Furfural (g/L)*Furfural (g/L)	1,1327646	1,197042	0,95		0,3755	
HMF (g/L)*Furfural (g/L)	-0,301625	1,888024	-0,16		0,8776	
Ácido acético (g/L)*HMF (g/L)	-0,238469	1,888024	-0,13		0,9030	
Ácido acético (g/L)*Furfural (g/L)	-0,155713	1,888024	-0,08		0,9366	
HMF (g/L)(0,3,1,2)	0,0751408	1,447762	0,05		0,9601	
Ácido acético (g/L)(1,09,4,31)	0,0161732	1,445884	0,01		0,9914	

Coeficiente = resultados expressos para cada combinação de níveis na matriz de planejamento obtido por análise de regressão; t<sub>cal</sub> = valor de influência no processo (estatística do teste); p = probabilidade de significância do teste, a 3 graus de liberdade

Para as três linhagens analisadas, o efeito negativo da concentração de furfural sobre o crescimento celular foi constatado, evidenciado pelo valor negativo do coeficiente, apresentado na segunda coluna de cada tabela. Este foi o único efeito estatisticamente significativo dentre todos os avaliados, para um nível de confiança de 95%, evidenciados por valores de  $p$  menores que 0,05, apresentados na última coluna de cada uma das tabelas. Em alguns casos, especialmente no ponto de 12 horas, observou-se um efeito quadrático positivo do furfural frente ao crescimento celular, que não se mantém para as amostragens seguintes. Além disso, possíveis efeitos de interação entre compostos inibidores não foram identificados, como pode ser observado nos gráficos de Pareto contidos nas Tabelas 6 a 8. Nestes gráficos, as linhas azuis verticais representam o limite em que se define a significância dos efeitos em crescimento celular, de forma que são considerados efeitos significativos somente as barras que ultrapassam estas linhas. Portanto é possível concluir, a partir dos resultados deste planejamento experimental, que dentre os três compostos inibidores analisados, apenas o furfural é de fato prejudicial ao crescimento celular das linhagens de *S. cerevisiae*, nas concentrações definidas pelo planejamento experimental e nas condições experimentais utilizadas para o cultivo de *S. cerevisiae*. Não se pode descartar, com estas conclusões, possíveis efeitos sinérgicos entre os vários componentes presentes nos líquidos e que não foram contemplados nesta análise de DCCR.

Valores de  $p$  muito menores que 0,05 (destacados na última coluna) foram obtidos para o efeito linear da concentração de furfural. Estes valores muito baixos indicam que é improvável que efeito observado (inibição de crescimento) tenham sido fatores de acaso.

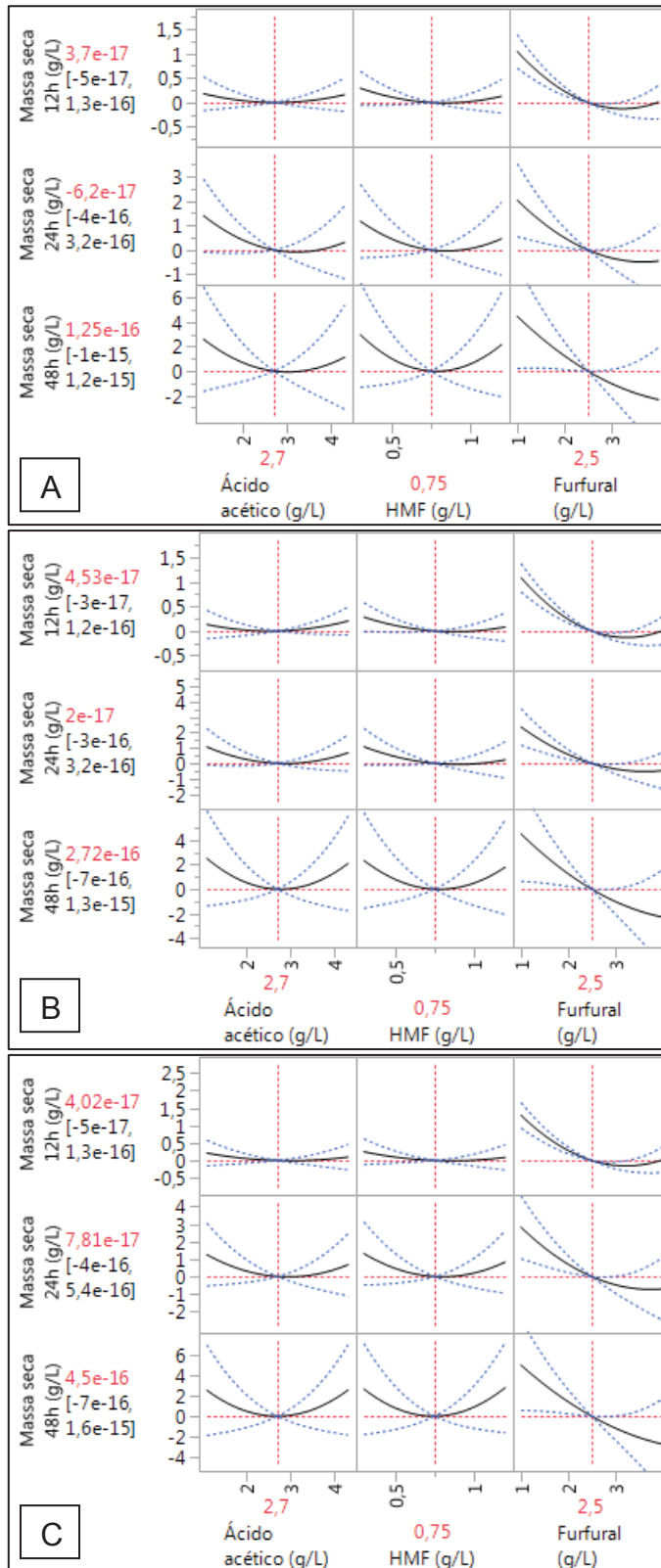
O efeito negativo da concentração de furfural sobre na cultura foi mais pronunciado nas primeiras 12 horas de cultivo, e foi reduzido em 24 e 48 horas, refletido pelo aumento do valor de  $p$ . Este resultado está de acordo com aquele da Figura 14, que mostra a redução linear da concentração de furfural nas 7-10 horas, implicando na redução do efeito negativo nas amostras de 24 e 48 horas.

Dessa forma, pode-se concluir que para todas as linhagens estudadas, o furfural afetou não só a cinética de crescimento do microrganismo como também seu rendimento final em células ao final do cultivo. Na Figura 15, fica mais evidente o perfil do efeito do furfural sobre o crescimento celular em cada um dos tempos de amostragem (no eixo  $y$  de cada gráfico), onde se observam as curvas de efeito com

relação ao crescimento em massa (base seca), que são mais acentuadas para o furfural, ao passo que para os outros compostos, as curvas se apresentam mais lineares em resposta à massa celular final.

Ao final de 48 horas, todos os cultivos tiveram suas viabilidades celulares avaliadas. A viabilidade celular das três linhagens foi superior a 95%, diferentemente dos dados obtidos na Figura 13, indicando que a queda na viabilidade observada nos líquidos estudados não pode ser atribuída aos níveis de ácido acético, HMF e furfural, e provavelmente deve-se a uma inibição desencadeada pela sinergia entre eles com os demais compostos do líquido. Ainda assim, uma vez que o crescimento parece estar atrelado à redução de compostos furanos no meio de cultura (mais especificamente o furfural, de acordo com as análises de DCCR), justifica-se a relevância em se desenvolver linhagens mais resistentes a estes compostos.





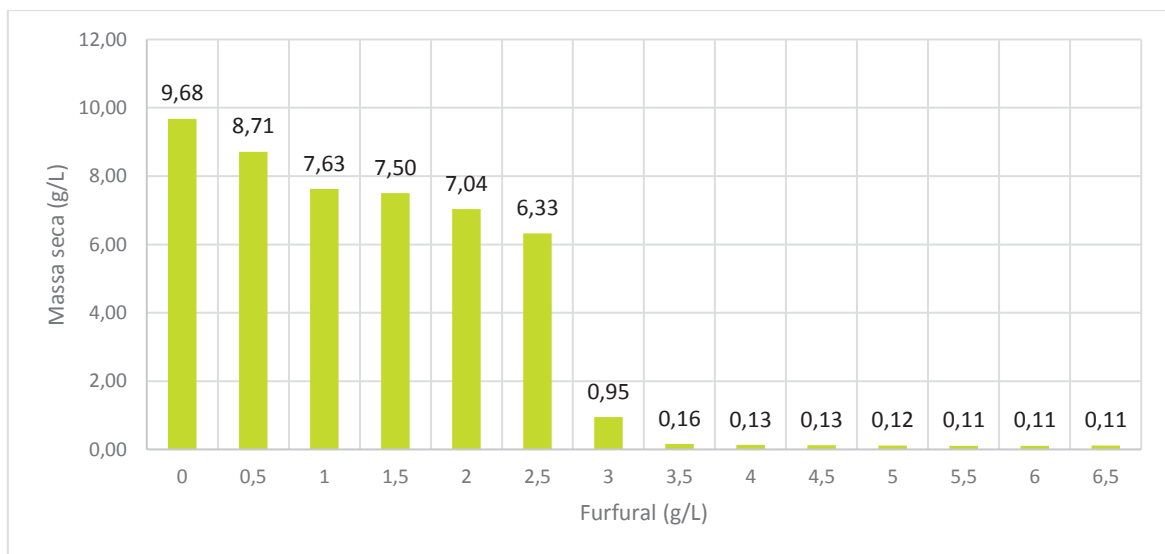
**Figura 15** - Efeito do ácido acético, HMF e furfural sobre o crescimento celular das linhagens CAT-1 (A), PE-2 (B) e SA-1 (C).

## 6.4 ENGENHARIA EVOLUTIVA

Uma vez que todas as três linhagens de *S. cerevisiae* apresentaram um comportamento bastante semelhante nos estudos anteriores, foi escolhida a linhagem CAT-1 como linhagem parental para dar prosseguimento ao trabalho de engenharia evolutiva.

### 6.4.1 Determinação do estresse inicial imposto

A partir de um inóculo de 0,1 g/L em massa seca da levedura CAT-1 e 24 horas de cultivo em meio YPD contendo diferentes concentrações de furfural, obteve-se o perfil ilustrado na Figura 16.



**Figura 16** - Resposta em crescimento celular da levedura CAT-1 frente a diferentes concentrações de furfural em meio sintético.

Observa-se uma queda essencialmente linear na massa de células ao final de um cultivo de 24 horas até a concentração de 2,5 g/L de furfural.

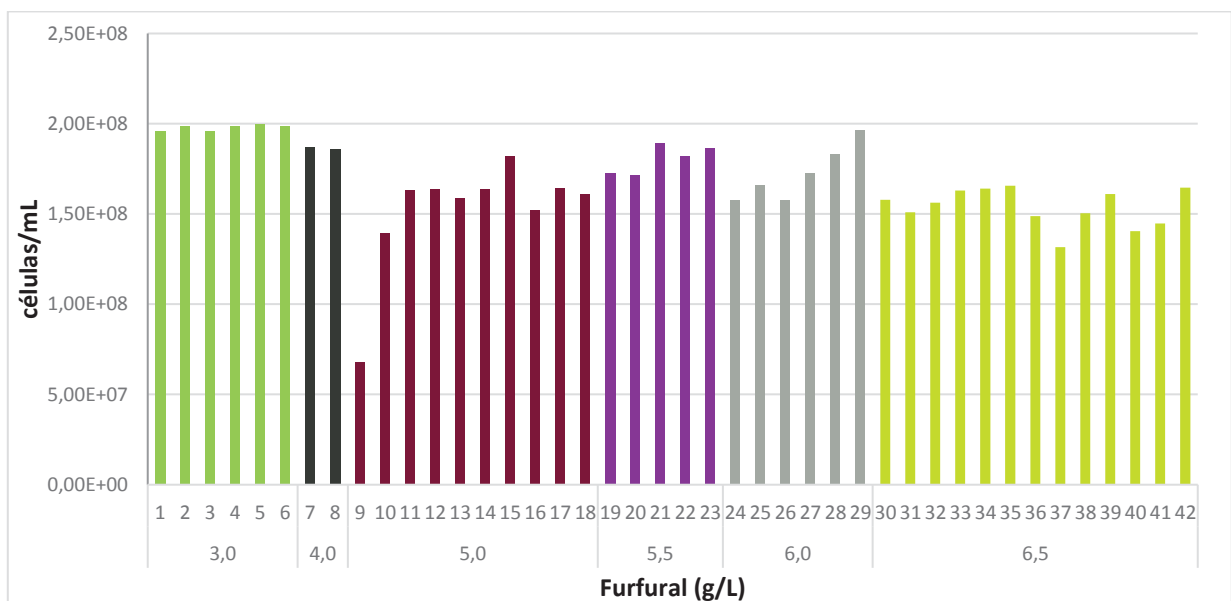
Quando as células são submetidas a uma concentração de 3,0 g/L do composto, há uma redução bastante significativa no crescimento celular, que não segue a tendência de redução das concentrações anteriores. Ao passo que, para as concentrações seguintes, praticamente não há crescimento e multiplicação celular.

Sendo assim, o trabalho de engenharia evolutiva iniciou-se com uma pressão imposta às células de 3,0 g/L de furfural.

#### 6.4.2 Evolução adaptativa

Nesta etapa, a fim de aumentar a probabilidade de se obter uma estirpe variante mais resistente, o inóculo inicial de cada batelada foi aumentado para 0,5 g/L, que correspondem a  $1,6 \cdot 10^7$  células/mL, em meio YPD contendo as concentrações de furfural indicadas na Figura 17.

A Figura 17 mostra a evolução do número de células em cada batelada na presença de furfural. Nela, está plotada a concentração de células ao final de cada batelada contra a concentração de furfural a que as células foram submetidas.



**Figura 17** - Dinâmica de transferência de bateladas da engenharia evolutiva. O eixo vertical representa a concentração de células ao final de cada batelada. No eixo horizontal, estão os números sequenciais de cada batelada, bem como a concentração de furfural correspondente.

Foram realizadas, ao todo, 42 bateladas sequenciais, sendo que as transferências ocorreram a cada 24 horas para as concentrações de furfural de 3,0, 4,0 e 5,0 g/L e a cada 48 horas para as demais concentrações. É importante ressaltar que, nesta etapa, o aumento na concentração inicial do inóculo levou a concentrações finais de células mais altas que as obtidas na Figura 16, onde o

inóculo inicial era de 0,1 g/L. Ao final das bateladas de número 34 e 42, um estoque foi realizado, conforme descrito na seção de Material e Métodos, para posterior análise da eficácia da engenharia evolutiva. Estas estirpes foram denominadas, respectivamente, A-6.5 e B-6.5, e podem tratar-se, na verdade, de populações heterogêneas, uma vez que não houve o isolamento de colônias.

A partir do número de células inicial e final de cada batelada, foi possível calcular o número de gerações de cada uma delas. A Tabela 9 traz um resumo destas informações para cada uma das duas estirpes selecionadas, bem como do tempo em horas pelo qual o processo de engenharia evolutiva perdurou.

**Tabela 9** - Número de bateladas, gerações e tempo de engenharia evolutiva para obtenção das linhagens A-6.5 e B-6.5

	<b>A-6.5</b>			<b>B-6.5</b>		
<b>Furfural (g/L)</b>	Número de bateladas	Número de gerações	Tempo (h)	Número de bateladas	Número de gerações	Tempo (h)
<b>3,0</b>	6	21,9	144	6	21,9	144
<b>4,0</b>	2	7,1	48	2	7,1	48
<b>5,0</b>	10	32,2	240	10	32,2	240
<b>5,5</b>	5	17,6	240	5	17,6	240
<b>6,0</b>	6	20,7	288	6	20,7	288
<b>6,5</b>	5	16,6	240	13	42,6	624
<b>Total</b>	<b>34</b>	<b>116,0</b>	<b>1200</b>	<b>42</b>	<b>142,05</b>	<b>1584</b>

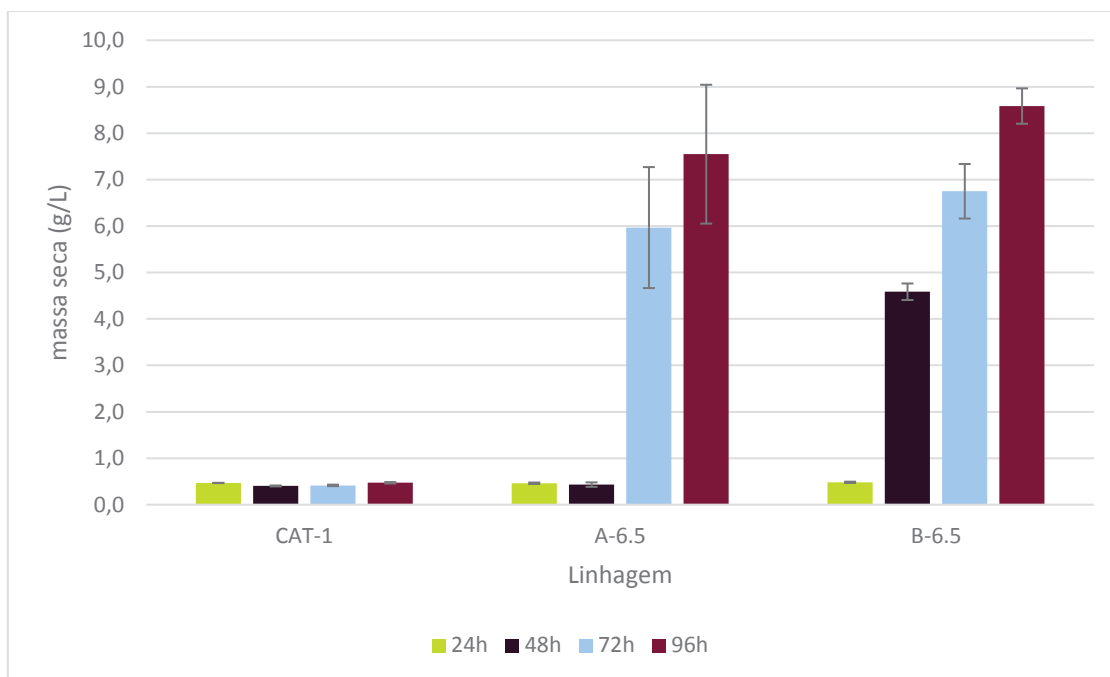
Sendo assim, considerando-se a obtenção da última cepa selecionada (B-6.5), o processo durou 1584 horas, de forma que houve 142 gerações ao longo das transferências em pouco mais de dois meses.

As duas cepas selecionadas foram então submetidas a alguns estudos que visavam avaliar a estabilidade do fenótipo adquirido, bem como suas performances nos líquidos estudados.

#### 6.4.3 Avaliação das linhagens obtidas

As cepas A-6.5 e B-6.5, estocadas em glicerol a -80°C, foram reativadas em meio YPD convencional, bem como sua linhagem parental CAT-1. Todas as linhagens foram então inoculadas em meio YPD contendo 6,5 g/L de furfural e tiveram seu crescimento em massa seca avaliado em 24, 48, 72 e 96 horas de

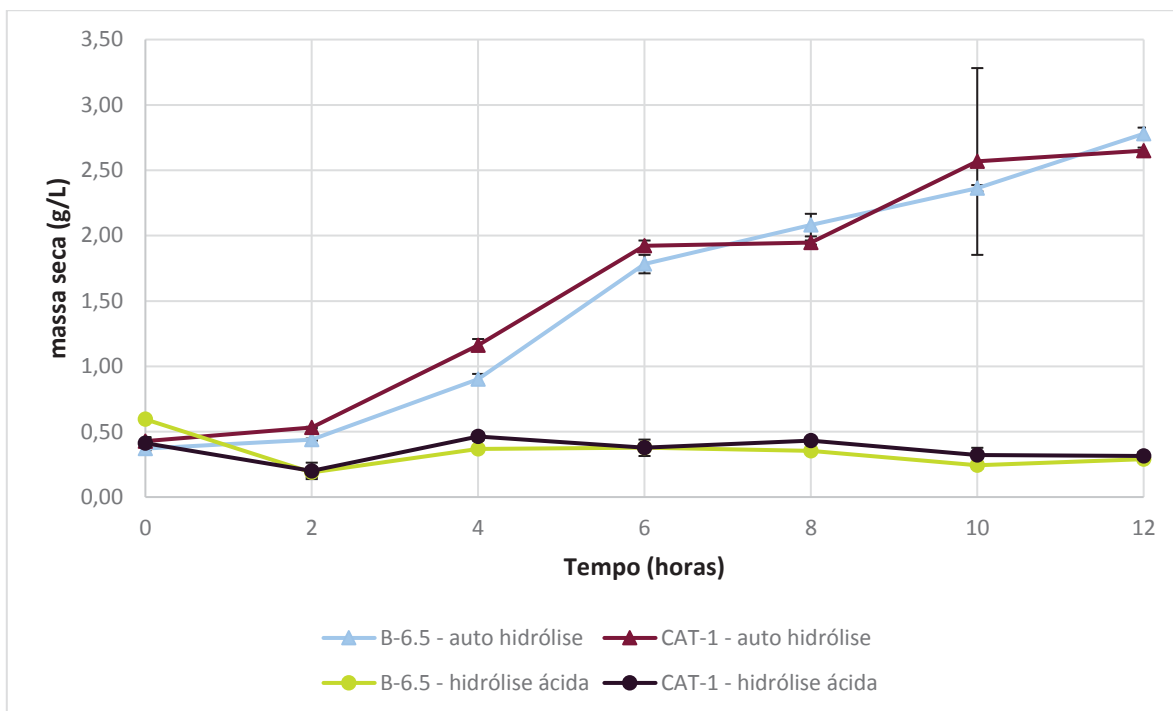
cultivo. O inóculo inicial nesta etapa foi de 0,1 g/L de células em base seca, de forma que os resultados fossem comparáveis aos apresentados na Figura 16. Os resultados estão ilustrados na Figura 18.



**Figura 18** - Crescimento celular em massa seca em meio YPD contendo 6,5 g/L de furfural das linhagens A-6.5, B-6.5 e da parental CAT-1, após reativação.

Claramente as estirpes selecionadas A-6.5 e B-6.5 apresentaram um fenótipo diferenciado em relação a estirpe parental CAT-1 no que diz respeito ao crescimento na presença de uma alta concentração de furfural, seja por resistência adquirida ao composto ou por uma melhora em sua capacidade de metabolização. Ainda, pode-se dizer que as bateladas adicionais a que a linhagem B-6.5 foi submetida, também refletiram em maior resistência ao furfural, já que apresentou crescimento significativo em 48 horas, ao passo que, para a linhagem A-6.5, no mesmo tempo, ainda não havia sido possível observar qualquer crescimento. Eventualmente, a estirpe B-6.5 poderá servir de ponto de partida caso uma linhagem mais eficiente seja necessária.

A fim de avaliar a performance da linhagem B-6.5 nos licores “auto hidrólise” e “hidrólise ácida”. A linhagem foi submetida à mesma avaliação de cinética de crescimento que as linhagens CAT-1, PE-2 e SA-1. A Figura 19 traz a comparação de performance em crescimento de B-6.5 com sua linhagem parental, CAT-1.



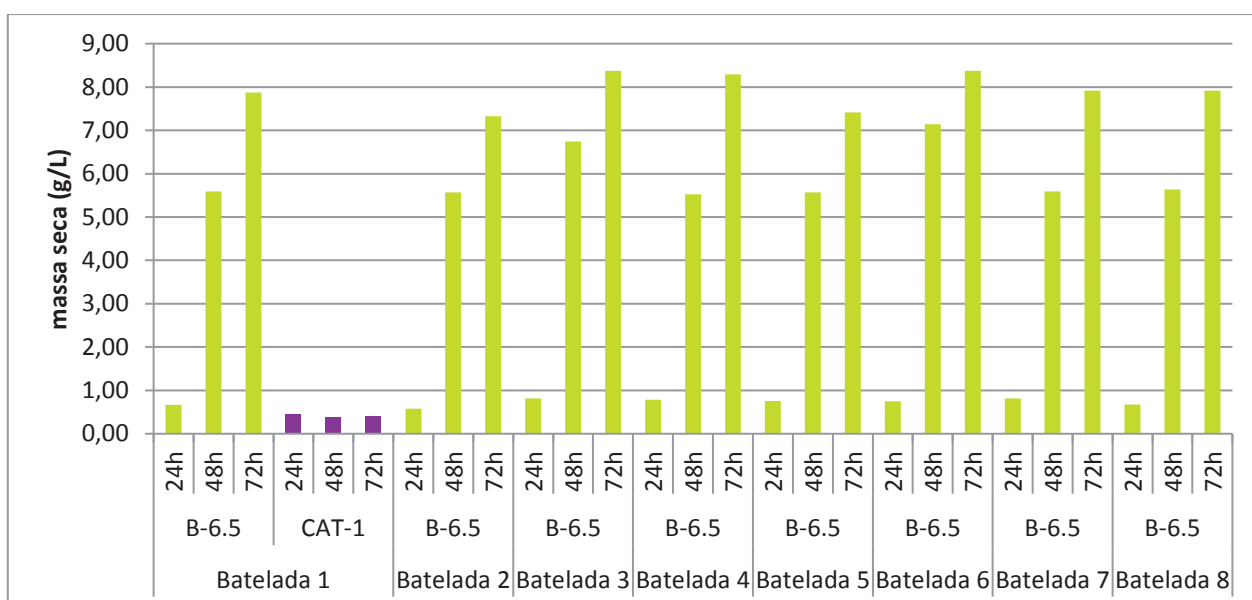
**Figura 19** - Comparação das cinéticas de crescimento em liquores das estirpes CAT-1 e B-6.5.

Nesta avaliação, não houve melhora no desempenho da linhagem B-6.5 comparativamente à sua linhagem parental CAT-1. Existem outros fatores além da concentração de furfural presentes nestes liquores que também podem afetar negativamente o crescimento celular. Um deles é o estresse osmótico, que já foi discutido na seção 6.2. Outro ponto é o fato de que estes meios possuem grande quantidade de compostos inibidores que não foram incluídos na avaliação de DCCR, além de compostos que não puderam ser detectados através das metodologias disponíveis para a caracterização dos materiais.

Mesmo após os resultados promissores, era preciso avaliar se a mutação estava de fato ancorada nos genes da linhagem obtida e garantir que não se tratava apenas de uma alteração epigenética. Trata-se de um estudo bastante importante quando se está desenvolvendo uma linhagem modificada para comercialização e aplicações industriais. Isto se deve ao fato de que, muitas vezes, o processo de transferências para concentrações crescentes de um composto que represente um desafio para o microrganismo levando a uma adaptação epigenética, ou seja, que não envolve alteração da sequência do DNA (SHAPIRO, 2002). Assim, quando a pressão é retirada e a linhagem é submetida novamente ao desafio inicial, a

característica aparentemente adquirida se perde, como ocorreu por exemplo no trabalho já citado na Tabela 1, de WRIGHT e colaboradores (2011).

Sendo assim, a linhagem B-6.5 foi cultivada ao longo de 8 bateladas sem a presença de furfural, de forma que, a cada batelada, uma parte deste cultivo foi também transferida a meio contendo 6,5 g/L de furfural para análise de crescimento em massa seca em 24, 48 e 72 horas, e outra utilizada para inocular meio sem furfural. A linhagem CAT-1 foi submetida a este processo por uma batelada, como forma de controle. Os resultados desta avaliação podem ser observados na Figura 20.



**Figura 20** - Crescimento em massa seca na presença de furfural da linhagem B-6.5. O número da batelada representa também a quantidade de bateladas que a estirpe foi cultivada na ausência de furfural antes de ser submetida a esta condição.

Observa-se, no gráfico apresentado na Figura 20, que o fenótipo observado foi mantido e que os dados estão bastante consistentes com os apresentados na primeira avaliação (Figura 18). Além disso, mais uma vez a linhagem parental CAT-1 não apresentou crescimento ao longo de 72 horas, evidenciando que de fato houve uma melhoria na adaptação frente a uma alta concentração de furfural provocada pelo processo de engenharia evolutiva.

Ao final de cada batelada em YPD livre de furfural, de posse da concentração final de células no momento da transferência para o meio que continha furfural, foi possível calcular o número de gerações pelas quais o fenótipo se

manteve. Cada batelada representava 4 gerações, de forma que é possível afirmar, então, que o fenótipo se manteve ao longo de 32 gerações. Trata-se de um resultado bastante interessante, que sinaliza que muito provavelmente houve uma mutação genética ao longo do experimento de engenharia evolutiva e que não se trata uma alteração epigenética transitória, onde não ocorre mudança na sequência genética.

Na literatura, e de acordo com o que foi mostrado na Tabela 1, trabalha-se com concentrações em torno de 1,0 g/L de furfural. Para além dos trabalhos já citados, KEATING e colaboradores (2006) demonstraram uma inibição de 25% na produtividade de etanol da cepa de *S. cerevisiae* Y-1528 quando submetida à presença de 1,6 g/L de furfural. LIU e colaboradores (2004), reportaram um aumento na fase *lag* de crescimento na presença de 1,0 e 3,0 g/L de furfural, bem como a completa inibição do crescimento na presença de 6,0 g/L do composto, para a cepa ATCC 211239. TAHERZADEH e colaboradores (1999) demonstraram em seu trabalho uma inibição de 73 a 93% no crescimento de diversas linhagens de *S. cerevisiae* na presença de 4,0 g/L de furfural, bem como a completa inibição no crescimento quando eram submetidas a concentrações acima de 5,0 g/L do inibidor.

Sendo assim, o fato da linhagem selecionada neste trabalho, B-6.5, manter sua característica adquirida ao longo de algumas gerações é bastante relevante. Alia-se a isto a capacidade de multiplicação na presença de uma concentração de 6,5 g/L de furfural, que representa uma concentração alta e bastante significativa frente aos estudos que já foram reportados.



## 7 CONCLUSÃO

Ficou demonstrado que as estirpes industriais empregadas no processo de produção de etanol de primeira geração possuem a capacidade de metabolizar o HMF e o furfural contidos nos licores estudados. O delineamento experimental DCCR mostrou-se bastante eficiente na definição dos efeitos que cada inibidor pode provocar nas células de levedura. No estudo desenvolvido, o DCCR apontou o furfural como único responsável pelos efeitos negativos observados com relação ao crescimento para as linhagens CAT-1, PE-2 e SA-1, dentre as variáveis independentes testadas. Entretanto, uma vez que a linhagem B-6.5 não apresentou desempenho superior nos licores, sugere-se um estudo mais abrangente incluindo outras classes de inibidores além dos abordados (ácido acético, HMF e furfural).

A metodologia de engenharia evolutiva empregada permitiu obter a linhagem B-6.5 capaz de resistir a altas concentrações de furfural (6,5 g/L). Esta é a linhagem com maior resistência já reportada na literatura. A linhagem parental, CAT-1, não apresentou qualquer capacidade de crescimento nestas mesmas condições em todos os testes realizados. Além disso, foi possível demonstrar a manutenção do fenótipo adquirido após 32 gerações da linhagem B-6.5 cultivada na ausência de qualquer inibidor, sinalizando que possivelmente a engenharia evolutiva permitiu a seleção de uma mutação, e que não se trata de uma alteração epigenética. Recomenda-se, para a consolidação desse trabalho, o sequenciamento genômico das linhagens obtidas para identificação dos sítios mutados. Tais resultados serão importantes para o aperfeiçoamento de linhagens através de engenharia genética, ou até mesmo transferência dessa capacidade para outras leveduras industriais.

O objetivo do projeto foi, desta forma, atingido com a obtenção da linhagem B-6.5. Propõe-se, a partir do estudo desenvolvido, aliar um trabalho de engenharia evolutiva para melhorar a tolerância desta linhagem frente aos outros possíveis inibidores, bem como utilizar técnicas de engenharia metabólica clássica para a inserção de uma rota de metabolização de pentoses na estirpe melhorada. Existe, assim, o potencial de se gerar uma linhagem comercialmente interessante, combinando características de robustez frente ao processo industrial com as características adquiridas para a viabilização do processo. Esta linhagem, por já apresentar o *background* da sua linhagem parental CAT-1, atenderia ao desenvolvimento da indústria de segunda geração brasileira de uma forma bem

específica, de forma que seria possível considerar alternativas como reciclagem celular, que já é empregado na indústria da primeira geração, por exemplo, além de um processo integrado, como mencionado anteriormente. Estudos como este possuem muito valor e potencial no sentido de promover o desenvolvimento da indústria nacional de biocombustíveis.

## REFERÊNCIAS

- ALKIM, C. et al. Evolutionary engineering of yeast. In: **Yeast Metabolic Engineering: Methods and Protocols**. Nova Iorque: Springer, 2014. cap. 10, p. 169-183.
- ALMARIO, M. P. et al. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced tolerance to hydrolysates of lignocellulosic biomass. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 110, n. 10, p. 2616-2623, 2013.
- ALMEIDA, J. R. M. et al. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, n. 4, p. 340-349, 2007.
- ALMEIDA, J. R. M. et al. Metabolic effects of furaldehydes and impacts on biotechnological processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 4, p. 625-638, 2009.
- ALONSO, D. M. et al. Bimetallic catalysts for upgrading of biomass to fuels and chemicals. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 24, p. 8075-8098, 2012.
- ALVIRA, P., et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource Technology**, v.101, p. 4851-4861, 2010.
- AMORES, I. et al. Ethanol production from sugarcane bagasse pretreated by steam explosion. **Electronic Journal of Energy & Environment**, v. 1, n. 1, p. 25-36, 2013.
- AMORIM, H. V. **Introdução à bioquímica da fermentação alcoólica**. Araras, 1977, 95p.
- ANDRIETTA, M. G. S. et al. Bioethanol – What has Brazil learned about yeasts inhabiting the ethanol production processes from sugar cane? **Biofuel Production-Recent Developments and Prospects**, v. 2, p. 67 – 84, 2011.
- ASK, M. et al. The influence of HMF and furfural on redox-balance and energy-state of xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 1, 2013.
- BAILEY, J. E. et al. Inverse metabolic engineering: a strategy for directed genetic engineering of useful phenotypes. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 52, n. 1, p. 109-121, 1996.

BANERJEE, N. et al. Inhibition of glycolysis by furfural in *Saccharomyces cerevisiae*. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 11, n. 4, p. 226-228, 1981.

BASSO, L. C. et al. **Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation**. INTECH Open Access Publisher, 2011.

BASSO, Luiz C. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS yeast research**, v. 8, n. 7, p. 1155-1163, 2008.

ÇAKAR, Z. P. et al. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved industrially important properties. **FEMS yeast research**, v. 12, n. 2, p. 171-182, 2012.

FERREIRA-LEITÃO, V. et al. Biomass residues in Brazil: availability and potential uses. **Waste and Biomass Valorization**, v. 1, n. 1, p. 65-76, 2010.

HAALAND, P. D. **Experimental design in biotechnology**. CRC press, 1989.

HANLY, T. J.; HENSON, M. A. Dynamic model based analysis of furfural and HMF detoxification by pure and mixed batch cultures of *S. cerevisiae* and *S. stipitis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, n. 2, p. 272-284, 2014.

HORVÁTH, I. S. et al. Effects of furfural on the respiratory metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in glucose-limited chemostats. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 7, p. 4076-4086, 2003.

JACQUET, N. et al. Influence of steam explosion on physicochemical properties and hydrolysis rate of pure cellulose fibers. **Bioresource Technology**, v. 121, p. 221–227, 2012.

JACQUET, N. et al. Application of steam explosion as pretreatment on lignocellulosic material: a review. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 54, n. 10, p. 2593-2598, 2015.

JÖNSSON, L. J. et al. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 16, 2013.

KAAR, W. E. et al Steam explosion of sugarcane bagasse as a pretreatment for conversion to ethanol. **Biomass and Bioenergy**, v. 14, n. 3, p. 277-287, 1998.

KEATING, J. D. et al. Tolerance and adaptation of ethanologenic yeasts to lignocellulosic inhibitory compounds. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 93, n. 6, p. 1196-1206, 2006.

KLING, S. H. et al. Enhancement of enzymatic hydrolysis of sugar cane bagasse by steam explosion pretreatment. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 29, n. 8, p. 1035-1039, 1987.

LANDAETA, R. et al. Adaptation of a flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain to lignocellulosic inhibitors by cell recycle batch fermentation. **Applied Energy**, v. 102, p. 124-130, 2013.

LARSON, E. D. **Biofuel production technologies**: status, prospects and implications for trade and development. Paper presented at the United Nations conference on trade and development (UNCTAD), 2008.

LIU, Z. L. et al. Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2, 5-bis-hydroxymethylfuran. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 345-352, 2004.

LIU, Z. L. et al. Evolutionarily engineered ethanologenic yeast detoxifies lignocellulosic biomass conversion inhibitors by reprogrammed pathways. **Molecular Genetics and Genomics: MGG**, v. 282, n. 3, p. 233-244, 2009.

MARTÍN, C. et al. Comparison of the fermentability of enzymatic hydrolyzates of sugarcane bagasse pretreated by steam explosion using different impregnating agents. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98, n. 1-9, p. 699-716, 2002.

MARTÍN, C. et al. Adaptation of a recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strain to a sugarcane bagasse hydrolysate with high content of fermentation inhibitors. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 9, p. 1767-1773, 2007.

MCMILLAN, J. D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. **ACS symposium series (USA)**, p. 292-324, 1994.

MIRA, N. P. et al. Adaptive response and tolerance to weak acids in *Saccharomyces cerevisiae*: a genome-wide view. **Omics: a journal of integrative biology**, v. 14, n. 5, p. 525-540, 2010.

MOREIRA, B. L. D. et al. Estudo de linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* oriundas da biodiversidade ambiental na fermentação alcoólica. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 5, p. 1672-1677, 2013.

MORJANOFF, P. J.; GRAY, P. P. Optimization of steam explosion as a method for increasing susceptibility of sugarcane bagasse to enzymatic saccharification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 29, n. 6, p. 733-741, 1987.

NAIK, S. N., et al. Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 578-597, 2010.

NEVES, P. V. et al. Production of cellulosic ethanol from sugarcane bagasse by steam explosion: Effect of extractives content, acid catalysis and different fermentation technologies. **Bioresource Technology**, v. 208, p. 184-194, 2016.

OGEDA, T. L. et al. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.

OLIVEIRA, A. J. et al. **Métodos para o controle microbiológico na produção de açúcar e álcool**. Piracicaba: FERMENTEC/ FEALQ/ESALQ, 1996.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 17-24, 2000.

PENG, F. et al. Comparative study of hemicelluloses obtained by graded ethanol precipitation from sugarcane bagasse. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 14, p. 6305-6317, 2009.

PEREIRA, F. B. et al. Industrial robust yeast isolates with great potential for fermentation of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 161, p. 192-199, 2014.

PERRONE, G. et al. Reactive oxygen species and yeast apoptosis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1783, n. 7, p. 1354-1368, 2008.

POSTMA, E. et al. Enzymic analysis of the crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 468-477, 1989.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 863-871, 2003.

ROMANÍ, A. et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* ethanol strains PE-2 and CAT-1 for efficient lignocellulosic fermentation. **Bioresource Technology**, v. 179, p. 150-158, 2015

SAKIHAMA, Y. et al. Improved ethanol production from xylose in the presence of acetic acid by the overexpression of the HAA1 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 119, n. 3, p. 297-302, 2015.

SARITHA M. et al. Biological Pretreatment of Lignocellulosic Substrates for Enhanced Delignification and Enzymatic Digestibility. **Indian J Microbiol**, v. 52, n.2, p.122–130, 2012.

SASSNER, P. et al. Steam pretreatment of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-impregnated Salix for the production of bioethanol. **Bioresource technology**, v. 99, n. 1, p. 137-145, 2008.

SHAPIRO, J. A. Genome Organization and Reorganization in Evolution. **Ann. NY Acad. Sci**, v. 981, p. 111-134, 2002.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource technology**, v. 83, n. 1, p. 1-11, 2002.

SZCZERBOWSKI, D. et al. Sugarcane biomass for biorefineries: comparative composition of carbohydrate and non-carbohydrate components of bagasse and straw. **Carbohydrate Polymers**, v. 114, p. 95-101, 2014.

TAHERZADEH, M. J. et al. Conversion of furfural in aerobic and anaerobic batch fermentation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 87, n. 2, p. 169-174, 1999.

TENGBORG, C. et al. Comparison of SO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> impregnation of softwood prior to steam pretreatment on ethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 70, n. 1, p. 3, 1998.

TOMÁS-PEJÓ, E. et al. Adaptation of the xylose fermenting yeast *Saccharomyces cerevisiae* F12 for improving ethanol production in different fed-batch SSF processes. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 37, n. 11, p. 1211-1220, 2010.

VAN MARIS, A. J. A. et al. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 90, n. 4, p. 391-418, 2006.

WALLACE-SALINAS, Valeria; GORWA-GRAUSLUND, Marie F. Adaptive evolution of an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* for combined tolerance to inhibitors and temperature. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 1, 2013.

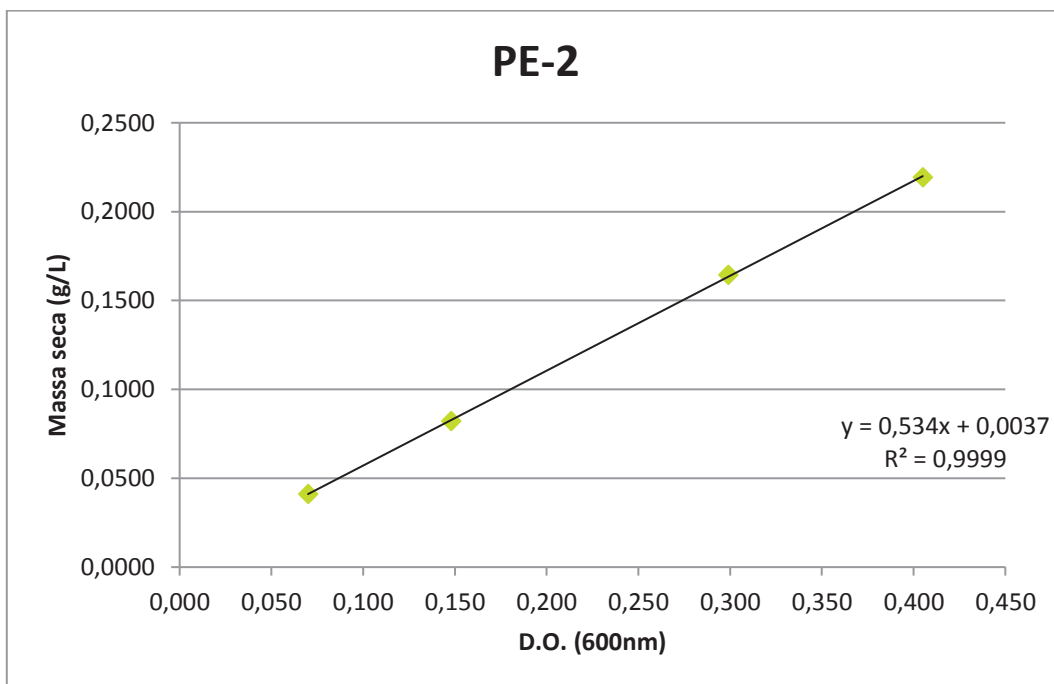
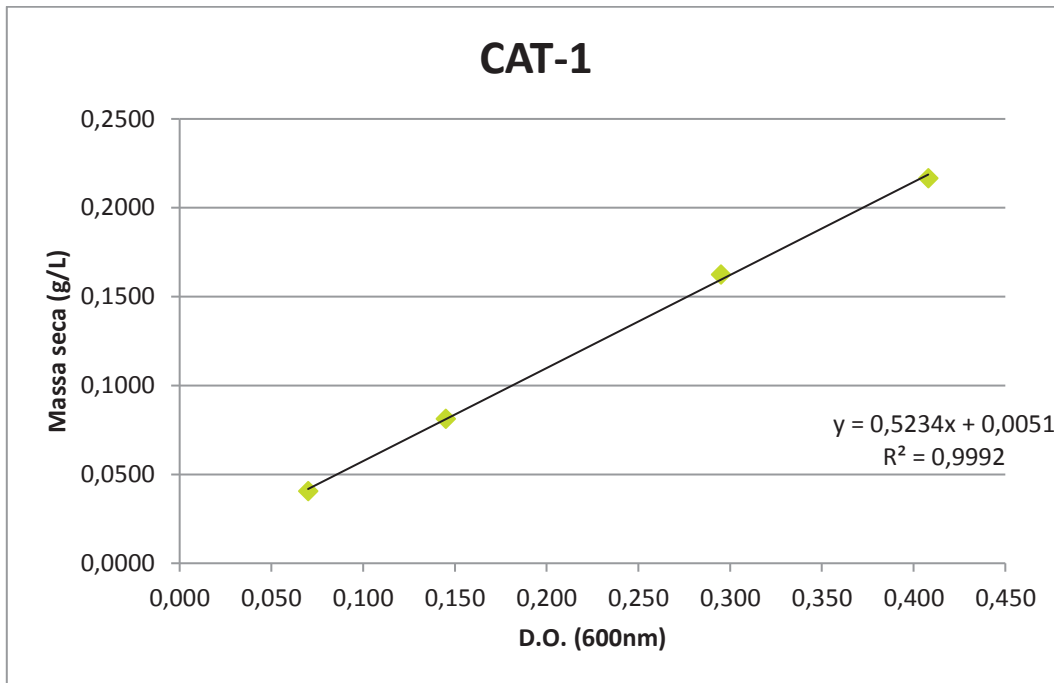
WISSELINK, H. W. et al. Novel evolutionary engineering approach for accelerated utilization of glucose, xylose, and arabinose mixtures by engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 4, p. 907-914, 2009.

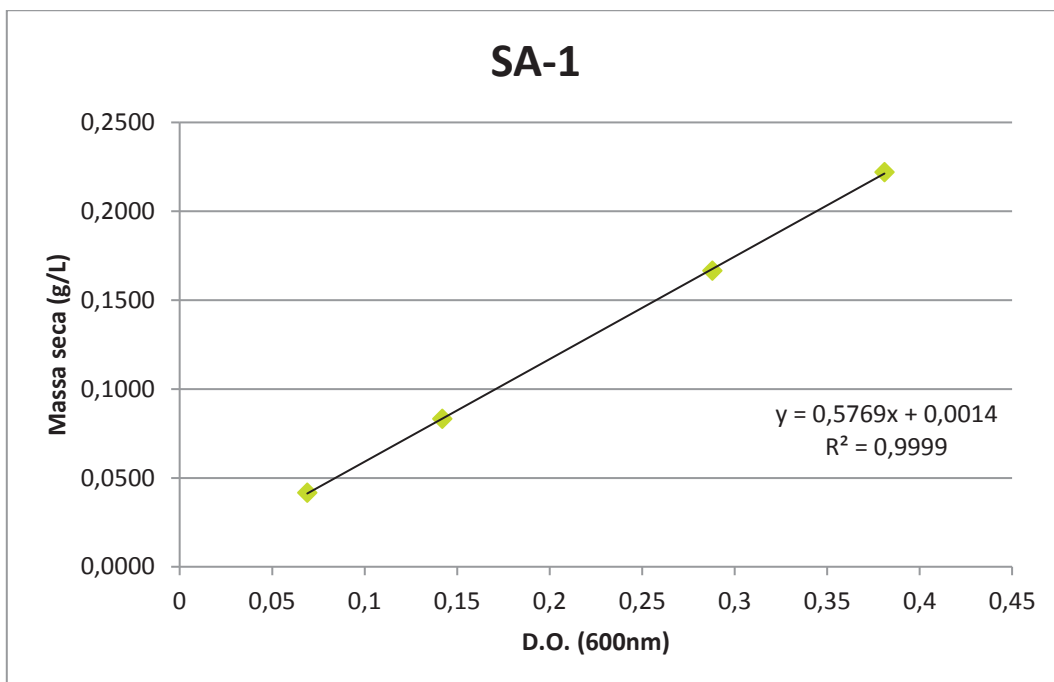
WRIGHT, J. et al. Batch and continuous culture-based selection strategies for acetic acid tolerance in xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 11, n. 3, p. 299-306, 2011.

ZHAO, Xuebing; ZHANG, Lihua; LIU, Dehua. Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 6, n. 4, p. 465-482, 2012.

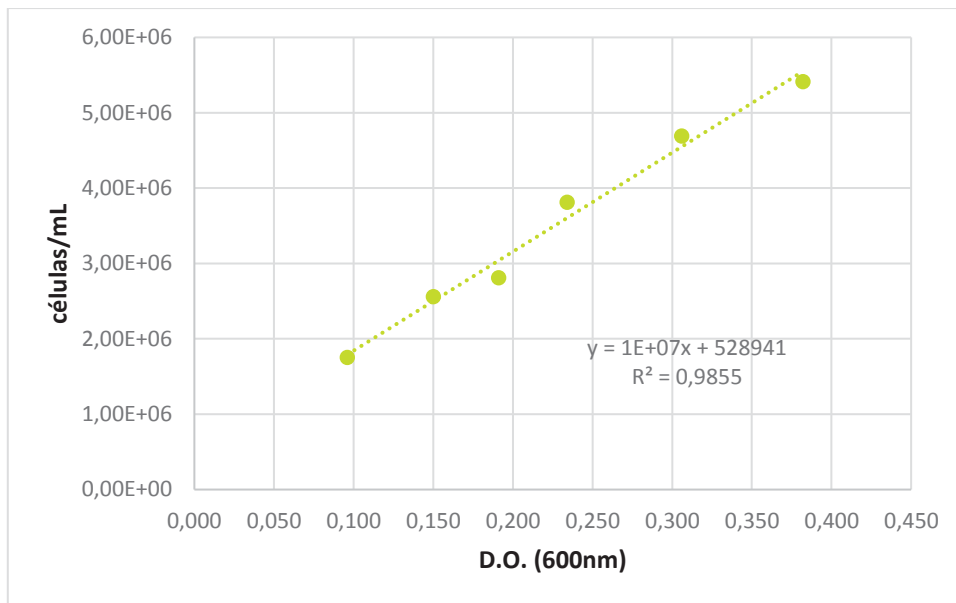


## ANEXO I – RELAÇÃO ENTRE MASSA SECA E DENSIDADE ÓTICA PARA AS LINHAGENS CAT-1, PE-2 E SA-1





## ANEXO II – RELAÇÃO ENTRE CONCENTRAÇÃO CELULAR E DENSIDADE ÓTICA



### ANEXO III – ACOMPANHAMENTO DOS LIQUORES SEM INÓCULO AO LONGO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO CELULAR

